



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2009

**Vera Armanda
Moreira da Silva**

**ACÇÃO DE EXTRACTOS DE *PTEROSPARTUM*
TRIDENTATUM EM RATINHOS EXPOSTOS A CCl₄**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2009

**Vera Armanda
Moreira da Silva**

**ACÇÃO DE EXTRACTOS DE *PTEROSPARTUM*
TRIDENTATUM EM RATINHOS EXPOSTOS A CCl₄**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e co-orientação da Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Apoio do CICECO e do Departamento
de Biologia

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira

Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira

Investigadora Auxiliar, CESAM

agradecimentos

Este trabalho foi realizado com a colaboração de várias pessoas a quem quero agradecer.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira pela sua orientação, disponibilidade e apoio.

À Professora Doutora Maria Helena Silva, minha co-orientadora, por me ter recebido no seu laboratório.

Agradeço à equipa do laboratório, principalmente à Rita Cerejeira, à Sónia Oliveira e à Cátia Santos pela disponibilidade e ajuda prestada ao longo deste trabalho.

Ao Sr. Aldiro Pereira e ao Sr. Armando Costa agradeço a ajuda prestada durante as experiências efectuadas.

Ao CICECO da Universidade de Aveiro agradeço os recursos concedidos para a realização deste trabalho.

Aos meus pais agradeço tudo o que sempre fizeram por mim, com maiores ou menores dificuldades.

Ao João agradeço o carinho, a companhia e a força que me transmitiu.

palavras-chave

Pterospartum tridentatum, fígado, baço, rim, toxicidade, tetracloreto de carbono, protecção.

resumo

Pterospartum tridentatum (L.) Willk., leguminosa que cresce espontaneamente em Portugal, é usada na medicina popular, no tratamento de irritações de garganta e em misturas herbais de várias plantas para o tratamento da diabetes. A formação de radicais livres que causam stress oxidativo pode constituir a base de muitas doenças. Por esta razão, o uso de ervas ou de compostos naturais delas isoladas é cada vez mais comum, com vista aos seus efeitos benéficos.

O objectivo do presente trabalho consistiu em estudar os efeitos histopatológicos de extractos de folhas e flores de *P. tridentatum* no fígado, baço e rim de ratinhos e a sua acção protectora após a administração de um tóxico, o CCl₄.

No estudo de toxicidade, utilizaram-se 27 ratinhos ICR-CD1 machos, divididos em 7 grupos: o grupo controlo negativo (NaCl 0,9%), 3 grupos aos quais foram injectados extractos de folhas nas concentrações 10 mg/kg, 100 mg/kg e 1000 mg/kg e outros 3 grupos aos quais foram administrados extractos de flores com as mesmas concentrações. Estes 7 grupos receberam uma injeção subcutânea diária durante 6 dias.

No estudo de protecção, 25 ratinhos ICR-CD1 foram divididos em 5 grupos: o grupo controlo positivo (CCl₄ 2ml/kg) recebeu duas injeções subcutâneas, uma no primeiro dia de ensaio e a segunda após 72 horas; 4 grupos foram tratados com as duas injeções de CCl₄ e injeções diárias de extractos de folhas nas concentrações de 5 mg/kg e 10 mg/kg e extractos de flores nas concentrações de 5 mg/kg e 10 mg/kg, durante 10 dias. Após sacrifício dos animais, o fígado, o baço e o rim foram removidos, fixados em solução de Bouin e preparados para estudos histológicos. Os cortes histológicos dos órgãos dos animais expostos aos extractos de folhas e flores revelaram lesões hemorrágicas mais frequentes nas concentrações de 100 mg/kg e 1000 mg/kg. O estudo de protecção revelou uma recuperação significativa nos vários órgãos quando comparado com o controlo positivo (CCl₄).

Em conclusão, o presente estudo revelou que os extractos de folhas e flores de *P. tridentatum* na concentração de 10 mg/kg não induziram alterações histopatológicas significativas ao nível do fígado, baço e rim e que após a administração de CCl₄, os mesmos extractos nas concentrações de 5 mg/kg e 10 mg/kg demonstraram ter um efeito protector nestes órgãos. Sugere-se que a actividade protectora se deve à presença de compostos bioactivos, como os compostos fenólicos, cuja actividade antioxidante é bem conhecida.

keywords

Pterospartum tridentatum, liver, spleen, kidney, toxicity, carbon tetrachloride, protection.

abstract

Pterospartum tridentatum (L.) Willk., a Leguminosae that grows spontaneously in Portugal, is used in folk medicine for throat irritation treatment, and herb mixtures for diabetes. The formation of free radicals that cause oxidative stress is on the base of some pathologies and the use of herbal or natural compounds isolated from plants to reduce them is increasingly common.

The aim of the present work was to study the histopathological effects of *P. tridentatum* extracts of leaves and flowers in the liver, spleen, and kidney of mice and their protective action after administration of the toxic CCl₄. In the toxicity study, 27 ICR-CD1 mice were used and divided into 7 groups: the negative control group (NaCl 0.9%), 3 groups were injected with leaves extracts in concentrations of 10 mg/kg, 100 mg/kg and 1000 mg/kg, and 3 other groups were administered with flowers extracts with the same concentrations. These 7 groups received a subcutaneous daily injection for 6 days. In the study of protection, 25 ICR-CD1 mice were divided into 5 groups: the positive control group (CCl₄ 2 ml/kg) received two subcutaneous injections, one on the first day of testing and the second one 72 hours later; 4 groups were treated with two CCl₄ injections and daily injections of leaves extracts at a concentration of 5 mg/kg and 10 mg/kg and flowers extracts at a concentration of 5 mg/kg and 10 mg/kg for 10 days. After sacrifice, the liver, spleen and kidney were removed, fixed in Bouin's solution and prepared for histological studies. Sections of organs exposed to leaves and flowers extracts showed more frequent hemorrhagic lesions in concentrations of 100 mg/kg and 1000 mg/kg. The protection study revealed a significant recovery in the various organs when compared with the positive control (CCl₄).

In conclusion, this study showed that extracts of *P. tridentatum* leaves and flowers at a concentration of 10 mg/kg did not induce significant histopathological changes in the liver, spleen and kidney and, after administration of CCl₄, the same extracts in concentrations of 5 mg/kg and 10 mg/kg supported the organs protection. We suggest that the protective activity is due to some bioactive elements, such as phenolic compounds, whose antioxidant activity is well known.

Índice

Capítulo I - Introdução	20
I. Introdução	22
I.1. <i>Pterospartum tridentatum</i>	22
I.2. Compostos bioactivos	23
I.2.1. Flavonóides	24
I.2.2. Propriedades biológicas dos flavonóides	25
I.3. Efeitos do CCl ₄ no organismo e mecanismos de toxicidade.....	27
I.4. O fígado	29
I.4.1. O fígado como órgão de biotransformação	32
I.5. O baço	35
I.6. O rim	36
I.7 Enquadramento do trabalho e objectivos.....	38
Capítulo II - Material e Métodos	40
II. Material e Métodos	42
II.1. Preparação dos extractos	42
II.2. Protocolo experimental de administração dos compostos em estudo.....	43
II.3.Preparação das amostras para Histologia	46
II.4. Análise estatística	47
Capítulo III - Resultados.....	48
III.1 Sobrevivência e comportamento dos animais	50
III.2 Aspecto macroscópico dos órgãos	50
III.3 Análise da massa dos ratinhos e respectivos órgãos	50
III.4 Alterações Histopatológicas	53
III.4.1. Alterações histopatológicas no fígado	53
III.4.2. Alterações histopatológicas no baço	58
III.4.3. Alterações histopatológicas no rim	63
Capítulo IV - Discussão dos Resultados	68
IV. Discussão dos Resultados	70
Capítulo V - Conclusões e Perspectivas Futuras	74
V.1 Conclusões.....	76
V.2 Perspectivas Futuras	76
Capítulo VI - Referências Bibliográficas.....	78
VI Referências Bibliográficas	80

Índice de Figuras

Figura 1 – <i>Pterospartum tridentatum</i> em floração.	22
Figura 2 – Vias metabólicas do CCl ₄ (Adaptado de Shah <i>et al.</i> , 1979).....	28
Figura 3 – Heterogeneidade de hepatócitos desde a região perilobular até à região centrolobular. As células da região perilobular são as primeiras a ter contacto com o sangue e a serem afectadas por este, enquanto que as células da região centrolobular entram em contacto com sangue que já sofreu alterações nas regiões anteriores (Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2008).	30
Figura 4 – Ultra estrutura do hepatócito. RER, retículo endoplasmático rugoso; SER, retículo endoplasmático liso X10000 (Junqueira e Carneiro, 2008).	31
Figura 5 – Relação das reacções de biotransformação da fase I e fase II (Adaptado de Sipes e Gandolfi 1991).	32
Figura 6 – Secção do baço observando-se as trabéculas emitidas pela cápsula e a organização das duas polpas (Junqueira e Carneiro, 2008).	36
Figura 7 – Secção do córtex renal, composto principalmente por túbulos contornados proximais (P), distais (D) e glomérulos renais (G) (Junqueira e Carneiro, 2008).	37
Figura 8 – Cortes histológicos do fígado (HE x400):.....	54
Figura 9 – Cortes histológicos do fígado (HE x400):.....	55
Figura 10 – Cortes histológicos do fígado (HE x400):.....	57
Figura 11 – Cortes histológicos do baço (HE) (x100):.....	59
Figura 12 – Cortes histológicos do baço (HE) (x400):.....	60
Figura 13 – Cortes histológicos do baço (HE):	62
Figura 14 – Cortes histológicos do rim (HE x400):	64
Figura 15 – Cortes histológicos do rim (HE x400):	65
Figura 16 – Cortes histológicos do rim (HE x400):	67

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Estruturas químicas e principais fontes dos oito principais subgrupos de flavonóides (Adaptado de Birt <i>et al.</i> , 2001 e Moon <i>et al.</i> , 2006).	24
Tabela 2 - Protocolo experimental do estudo de toxicidade.....	44
Tabela 3 - Protocolo experimental do estudo de protecção.....	45
Tabela 4 - Análise estatística dos rácios dos órgãos no estudo de toxicidade dos extractos de folhas.....	51
Tabela 5 - Análise estatística dos rácios dos órgãos no estudo de toxicidade dos extractos de flores.	51
Tabela 6 - Análise estatística dos rácios dos órgãos no estudo de protecção com extractos de folhas.....	52
Tabela 7 - Análise estatística dos rácios dos órgãos no estudo protecção com extractos de flores.	52
Tabela 8 - Principais alterações histológicas observadas no fígado de ratinhos nos tratamentos de toxicidade.....	53
Tabela 9 - Principais alterações histológicas observadas no fígado de ratinhos nos tratamentos de protecção.....	56
Tabela 10 - Principais alterações histológicas observadas no baço de ratinhos nos tratamentos de toxicidade.....	58
Tabela 11 - Principais alterações histológicas observadas no baço de ratinhos nos tratamentos de protecção.....	61
Tabela 12 - Principais alterações histológicas observadas no rim de ratinhos nos tratamentos de toxicidade.....	63
Tabela 13 - Principais alterações histológicas observadas no rim de ratinhos nos tratamentos de protecção.....	66

Capítulo I

Introdução

I. Introdução

I.1. *Pterospartum tridentatum*

Pterospartum tridentatum (L.) Willk. é uma leguminosa endémica da Europa, pertencente à subfamília Papilionoideae (Grosso *et al.*, 2007). É um subarbusto ou arbusto com 15–100 cm, prostrado ou erecto. Os caules dos ramos férteis apresentam 2–14 mm de largura, com 5 ou 6 pequenas costas. Estas são achatadas ondulado-tuberculadas, 2 das quais semelhantes a asas, opostas e mais ou menos desenvolvidas (Castroviejo, 1989). Em Portugal, esta planta é comum nas montanhas do interior Norte e Centro, onde é conhecida como carqueja ou carqueija. É durante a Primavera que desenvolve flores amarelas, utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de irritações de garganta e em misturas de várias ervas para o controlo de diabetes tipo 2 (Vítor *et al.*, 2004). A infusão das porções terminais secas em floração é usada como uma excelente bebida e emoliente mas também para problemas no fígado, bexiga, rins e reumatismo (Feijão, 1979 in Grosso *et al.*, 2007). Contudo, *P. tridentatum* é utilizada também como condimento tradicionalmente adicionado ao arroz e à carne assada (Grosso *et al.*, 2007).



Figura 1 – *Pterospartum tridentatum* em floração.

A análise fitoquímica de extractos aquosos de *P. tridentatum* revela a presença de alcalóides, compostos fenólicos (incluindo os flavonóides) e terpenóides glicosilados. A presença de vários compostos fenólicos e alcalóides, metabolitos secundários

característicos das leguminosas, conferem a estes extractos propriedades farmacotoxicológicas (Vítor *et al.*, 2004).

I.2. Compostos bioactivos

Os compostos fenólicos são compostos bioactivos que estão presentes em alimentos de origem vegetal como as frutas, legumes, cereais, vinhos e chás. As suas concentrações e tipos variam consoante a espécie ou variedade da planta, a luz incidente, grau de maturação, processamento e armazenamento. As plantas produzem mais de 8000 compostos fenólicos. Na natureza encontram-se como conjugados, por exemplo com monossacarídeos e dissacarídeos e têm tendência a serem solúveis em água (Duthie e Crozier, 2000).

Estudos prévios demonstraram que muitos compostos fenólicos dietéticos derivados de plantas são antioxidantes mais eficientes *in vitro* do que as vitaminas E ou C ou os carotenóides, e assim podem contribuir significativamente para os efeitos protectores *in vivo* (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Estudos experimentais em animais ou células em cultura realçam o papel dos flavonóides e outros compostos fenólicos na prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, cancro e osteoporose (Jiang e Dusting, 2003 in Scalbert *et al.*, 2005 e Nichenametla *et al.*, 2006). Contudo, é muito difícil prever os efeitos da administração dos compostos fenólicos na prevenção de doenças humanas. Uma das razões deve-se à utilização de procedimentos diversos, como doses ou concentrações das que o Homem ingere normalmente (Scalbert *et al.*, 2005). As concentrações máximas observadas no plasma são baixas, normalmente inferiores a 1µM, em parte devido à baixa absorção gastrointestinal e ao rápido metabolismo nos tecidos humanos e pelas bactérias do cólon (Halliwell *et al.*, 2005). Devido às baixas concentrações atingidas *in vivo*, os produtos fitoquímicos e outros nutracêuticos, têm sido sugeridos como exercendo acções benéficas nas células, não devido aos seus efeitos antioxidantes directos mas através da modulação de proteínas e enzimas, da expressão genética e de cascatas de sinalização (Williams *et al.*, 2004; Mandel *et al.*, 2005). Além disso, através destes mecanismos, a forma bioactiva de um antioxidante *in vivo* não é necessariamente o fitoquímico original, mas conjugados e metabolitos que surgem durante a absorção e passagem pelo fígado (Spencer *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2004).

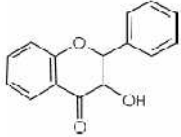
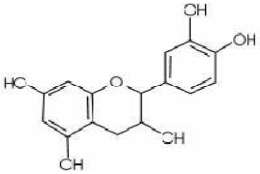
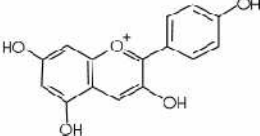
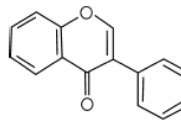
Os flavonóides são, dentro do grande grupo dos compostos fenólicos, dos mais abundantes e mais estudados, devido às suas propriedades antioxidantes.

I.2.1. Flavonóides

Os flavonóides são pigmentos universais das plantas. Quase sempre solúveis em água, são responsáveis pela cor das flores, frutos e, por vezes, das folhas (Bruneton, 1999). São compostos polifenólicos antioxidantes, tipicamente em conjugados de açúcares (Lean *et al.*, 1999). São a maior classe de polifenóis, com mais de 4000 compostos distintos identificados. São compostos de 15 carbonos com a estrutura fenilbenzopirona (C6-C3-C6), que possui dois anéis aromáticos (anéis A e B) unidos por 3 carbonos que normalmente se localizam num anel oxigenado heterocíclico, designado de anel C (Ross e Kasum, 2002 in Liu, 2004). Diferenças estruturais no anel C são usadas para a sua classificação (Tabela 1). Diferenças individuais dentro de cada grupo resultam da variação no número e arranjo dos grupos hidroxilo assim como da natureza e extensão da alquilação e/ou glicosilação destes grupos (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Tabela 1 - Estruturas químicas e principais fontes dos oito principais subgrupos de flavonóides (Adaptado de Birt *et al.*, 2001 e Moon *et al.*, 2006).

Designação	Estrutura	Exemplos	Substituição OH	Principais fontes alimentares
Estrutura Básica				
Calconas		Calconas		Lúpulo, cerveja
Flavonas		Chrisina Apigenina Luteolina	5, 7 5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Salsa, aipo, pimento vermelho doce, mel, própolis, tomilho
Flavonóides		Galagina Quenferol Fisetina Quercetina Miricetina	5, 7 5, 7, 4' 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4', 5'	Cebolas, cerejas, maçãs, brócolos, tomate, couve-lombarda, vinho tinto, bagas, trigo-mourisco
Flavanonas		Naringenina Eriodietiol	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Laranjas, uvas, ameixas

Flavanonóides		Taxifolina	5, 7, 3', 4'	Limão, laranja amarga
Flavanóides		Catequina Epicatequina Epigallocatequina	(+) – OH* (-) – OH* 5'	Chá, maçãs, cacau, vinho tinto
Antocianidinas		Pelargonidina Cianidina Delfinidina	3' 3', 5'	Cerejas, uvas, mirtilos
Isoflavonas		Daidzeína Genisteína	7, 4' 5, 7, 4'	Sementes de soja e legumes

*Posição do grupo OH na posição 3 relativa ao grupo fenólico na posição 2. Por isso, o prefixo "epi" é atribuído à configuração *cis* entre o grupo 3-OH e o grupo 3-fenólico.

Estudos realizados com *P. tridentatum* pela equipa de Grosso *et al.* (2007), relacionados com a sua composição em óleos essenciais, revelaram que as partes aéreas de diferentes populações colhidas durante a floração possuem na sua constituição *cis*-teaspiranos, que são agentes comuns responsáveis pelo aroma dos chás, ervas e pelo sabor ligeiramente picante das plantas.

I.2.2. Propriedades biológicas dos flavonóides

Vítor *et al.* (2004) estudaram os efeitos de flavonóides de um extracto de *P. tridentatum* na protecção de células endoteliais contra danos oxidativos. Uma análise fitoquímica a esse extracto revelou a presença de alcalóides, compostos fenólicos (incluindo flavonóides) e terpenóides glicosilados. As isoflavonas encontradas foram: sissotrina (5-hidroxi-4'-metoxi-isoflavona-7-O- β -glucoside); genistina (5,4'-dihydroxy-isoflavona-7-O- β -glucoside); 5,5'-Dihydroxy-3'-metoxi-isoflavona-7-O- β -Glucoside; prunetina (5,4'-dihydroxy-7-metoxi-isoflavona) e isoquercitrina (5,7,3',4'-tetrahydroxy-flavonol-3-O- β -glucoside).

Paulo *et al.* (2008) estudaram os efeitos opostos dos flavonóides isoquercitrina e sissotrina, isolados de *P. tridentatum*, na tolerância à glicose oral em ratos, concluindo que os doentes diabéticos deverão ser cuidadosos com a ingestão de infusões de *P. tridentatum*, uma vez que o extracto, ou seja, a combinação de concentrações relativas de isoquercitrina e sissotrina, pode diminuir ou aumentar os níveis de glicose no sangue após uma dose oral.

A principal propriedade dos flavonóides é a capacidade de diminuir a fragilidade e permeabilidade capilar. Em modelos animais, os flavonóides, também conhecidos como “vitamina P” ou “factor P”, podem diminuir os sinais de deficiência experimental em vitamina C. Certos sintomas de escorbuto, curáveis através da administração de sumo de limão, não são curáveis com a administração de apenas ácido ascórbico. Verificou-se que o ácido ascórbico só era activo com a combinação do “factor P” (Bruneton, 1999). O efeito dos flavonóides em sinergismo com a vitamina C sugere que dietas com relativamente elevadas doses de flavonóides, assim como em vitaminas antioxidantes convencionais deveriam ser recomendadas a pacientes com diabetes, podendo estes estar relativamente protegidos dos efeitos adversos a longo prazo (Lean *et al.*, 1999).

Existe também grande interesse na interacção entre os flavonóides e os radicais livres, e as suas potenciais aplicações na terapia preventiva. É largamente aceite que os compostos fenólicos, como os flavonóides, removem os radicais livres que se formam em diferentes circunstâncias, como em situações de anóxia, inflamação e peroxidação lipídica (Bruneton, 1999).

De uma forma geral, os flavonóides são inibidores enzimáticos *in vivo*, como por exemplo a quercetina que inibe a histidina descarboxilase e a aldose redutase. Também são responsáveis pela inibição de cAMP fosfodiesterase, de quinases de proteínas, entre outros. Vários flavonóides são potentes inibidores de 5-lipoxigenases, inibindo a produção de leucotrienos que medeiam as reacções inflamatórias e alérgicas. Em casos raros, os flavonóides podem estimular a actividade enzimática, como a da enzima prolina hidroxilase, cuja estimulação favorece a formação de ligações entre as fibras de colagénio, reforça a sua força e estabilidade e previne a sua desnaturação (Bruneton, 1999).

Outros flavonóides, como o grupo dos flavonóis incluem antioxidantes naturais muito conhecidos. O flavonol quercetina, assim como os seus derivados, tem demonstrado ser o mais activo, uma vez que possui todas as características estruturais para a sua actividade antioxidante (Pietta, 2000; Vítor *et al.*, 2004).

As isoflavonas são uma classe de metabolitos fenólicos das plantas, encontradas quase exclusivamente na subfamília Papilionoideae das Leguminosas. Actuam como moduladores selectivos de receptores de estrogénio, quinases de tirosina e inibidores da DNA topoisomerase, antioxidantes e são citostáticos e citotóxicos, dependendo da

concentração (Pietta, 2000). A mais simples 5-hidroxi-isoflavona é a genisteína cujos derivados genistina e prunetina demonstraram, num meio inorgânico, actividade de remoção de radicais livres e capacidade de inibir a formação de radicais superóxido gerados pela xantina/xantina oxidase (Paulo e Mota-Filipe, 2006).

Vários estudos foram realizados cujo objectivo incidiu no estudo das potencialidades protectoras ou regeneradoras de extractos de plantas, induzindo danos celulares com recurso a agentes tóxicos. Um dos agentes tóxicos mais frequentemente utilizados em experiências laboratoriais é o tetracloreto de carbono, cujos efeitos histopatológicos estão bem documentados.

I.3. Efeitos do CCl₄ no organismo e mecanismos de toxicidade

São bem conhecidos os efeitos adversos do tetracloreto de carbono (CCl₄) na saúde. É uma substância líquida transparente, de cheiro adocicado e muito volátil. É um produto químico pertencente à classe dos hidrocarbonetos halogenados, produzido laboratorialmente, muito utilizado até finais da década de 70 do século XX como insecticida, pesticida, em extintores ou produtos de limpeza a seco (Agency for Toxic Substances and Diseases Registry, 2005).

O CCl₄ pode entrar no organismo humano através do ar contaminado, ou através do estômago e intestino após a ingestão de alimentos ou água contendo este produto. Como alcano halogenado volátil que o CCl₄ é, tem efeitos no sistema nervoso central em situações de altos níveis de exposição, podendo causar cancro ou a morte. Para além disso tem efeitos sistémicos (ao nível respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, hematológico, hepático, renal e cutâneo), efeitos imunológicos, reprodutivos e de desenvolvimento (ATSDR, 2005).

A maioria dos efeitos tóxicos do CCl₄ absorvido está relacionada com o seu metabolismo, devido à acção das citocromo P-450 oxigenases (no Homem, principalmente CYP2E1, mas também CYP3A). Os mecanismos farmacocinéticos do CCl₄ ocorrem durante a absorção, distribuição, metabolismo e excreção. O CCl₄ atravessa as membranas celulares por difusão passiva, levando à rápida absorção pelos pulmões, tracto gastrointestinal e sistema circulatório (Sanzgiri *et al.*, 1997). Como é lipofílico, o CCl₄ absorvido difunde-se do sangue para o fígado, rim, cérebro e outros órgãos e acumula-se no tecido adiposo. O fígado é o alvo mais sensível no Homem e

nos animais expostos ao CCl_4 , independentemente da via de administração, devido à abundância de CYP2E1 e outros citocromos. A activação de CYP2E1 conduz ao aumento da produção de metabolitos reactivos. Alguns dos produtos resultantes do metabolismo do CCl_4 afectam as proteínas celulares, interferindo com as funções dos hepatócitos, tendo como consequência a morte celular e a consequente diminuição da função hepática. O rim também é sensível ao CCl_4 , sendo produzida menos urina o que leva à acumulação de água, principalmente nos pulmões, e à acumulação de produtos tóxicos no sangue. A paragem da função secretora dos rins foi a principal causa de morte em indivíduos expostos a concentrações elevadas de CCl_4 (ATSDR, 2005).

As vias metabólicas do CCl_4 estão ilustradas na figura 2 e os metabolitos identificados estão sublinhados. A bioactivação do CCl_4 prossegue através da dehalogenação reductiva dependente do citocromo P-450 (Sipes *et al.*, 1977 in Shah *et al.*, 1979).

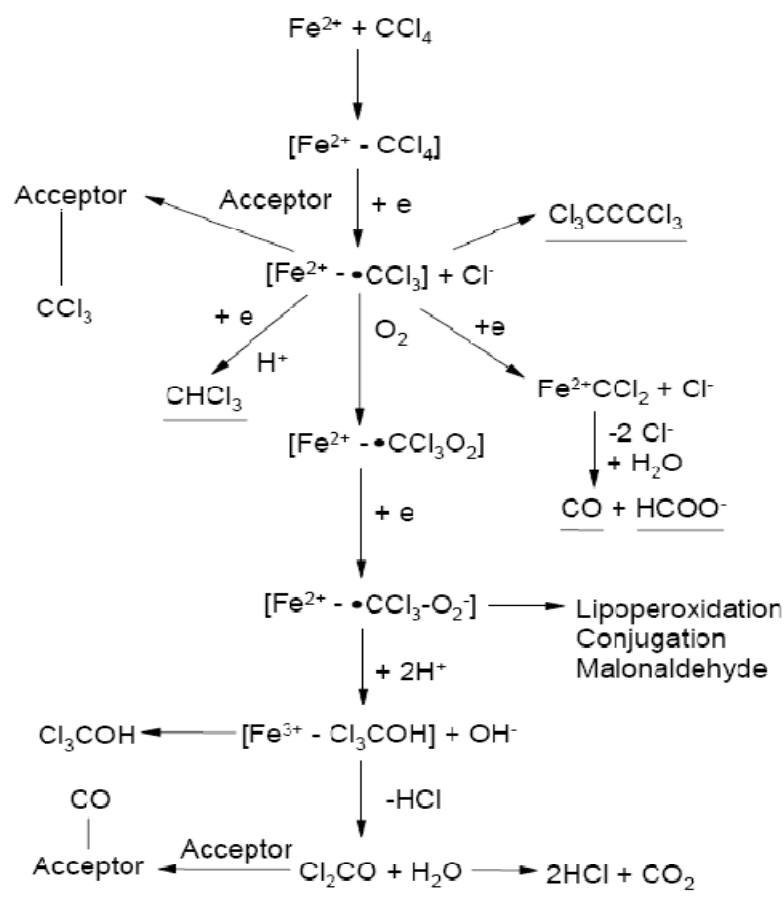


Figura 2 – Vias metabólicas do CCl_4 (Adaptado de Shah *et al.*, 1979).

Vários dados experimentais indicam que o primeiro passo envolve a clivagem da ligação de um carbono, formando-se um ião cloro e o radical triclorometil (Lai *et al.*, 1979).

O metabolismo do CCl_4 pelo CYP2E1 pode resultar na destruição da enzima durante o processo metabólico (Noguchi *et al.*, 1982). CYP2E1 pode ser destruído por acção directa (ligação covalente) dos radicais ao citocromo (Manno *et al.* 1992) ou por peroxidação lipídica resultando na libertação das proteínas P-450 das membranas do microsoma. A clivagem da ligação carbono – cloro mediada pelo citocromo P-450 é seguida da remoção do hidrogénio pelo radical triclorometil no grupo metileno dos ácidos gordos dos lípidos microsossomais, formando radicais livres orgânicos. Estes reagem rapidamente com moléculas de oxigénio, conduzindo à formação de radicais livres peroxi e, eventualmente peróxidos orgânicos que podem clivar e originar novos radicais livres que atacam os grupos metileno dos lípidos membranares (Recknagel *et al.*, 1977). Este processo autocatalítico e a peroxidação lipídica podem contribuir para a destruição da estrutura membranar, com consequente perda das suas funções.

No Homem e animais, o CCl_4 é eliminado por difusão passiva principalmente através do ar exalado e uma pequena fracção é eliminada na urina e nas fezes. (Thrall *et al.* 2000; Benson *et al.* 2001).

O CCl_4 , uma vez absorvido, tem efeitos tóxicos em vários órgãos do Homem como o fígado, o baço e o rim.

I.4. O fígado

O fígado é uma glândula anexa ao tubo digestivo e é o segundo maior órgão do corpo humano, representando cerca de 2% do peso corporal. Está estrategicamente posicionado, relativamente ao sistema circulatório, de forma a realizar as suas funções na manutenção da homeostasia metabólica do organismo (Junqueira e Carneiro, 2008).

É o primeiro órgão que contacta com o sangue, através da veia porta hepática, que esteve em contacto com o estômago e os intestinos. Por isso, o fígado é o primeiro órgão exposto aos nutrientes, metais, drogas, tóxicos ambientais e produtos metabólicos antes de entrarem na circulação sistémica (Haussinger, 1996; Moslen, 2001).

O fígado está organizado em unidades operacionais: os lóbulos hepáticos e o ácinos. O lóbulo hepático é composto por células do parênquima chamadas hepatócitos. O lóbulo hepático é um prisma hexagonal, medindo 1 a 2 mm e apresenta uma veia central a partir da qual irradiam placas de células hepáticas em direcção à periferia. Cada lóbulo é

rodeado por tecido conjuntivo interlobular que, nos cantos do lóbulo, constitui as tríadas porta onde se localizam vasos sanguíneos (veia interlobular e artéria interlobular), ducto biliar interlobular e vasos linfáticos. O lóbulo hexagonal está dividido em três regiões: a centrilobular (próximo da veia hepática), a zona-média e as regiões periportais. A base do ácino é formada pelos ramos terminais da veia porta e da artéria hepática que se estende pelos tractos porta (Moslen, 2001). O ácino possui três zonas que coincidem com as três regiões do lóbulo: a zona 1, a mais próxima da entrada do sangue, que recebe a mais alta concentração de oxigénio e nutrientes; a zona 3, adjacente à veia hepática terminal e a zona 2, intermédia. A organização destas unidades operacionais leva a um gradiente de oxigénio e nutrientes (Figura 3) (Kedderis, 1996).

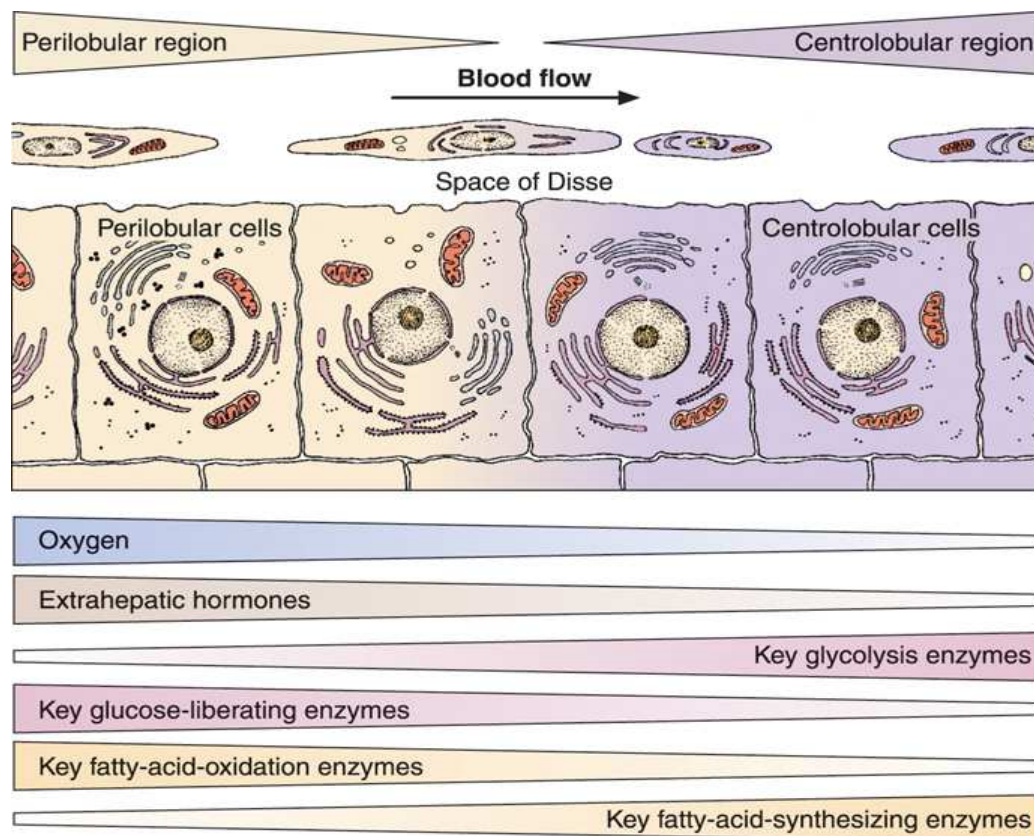


Figura 3 – Heterogeneidade de hepatócitos desde a região periportal até à região centrilobular. As células da região periportal são as primeiras a ter contacto com o sangue e a serem afectadas por este, enquanto que as células da região centrilobular entram em contacto com sangue que já sofreu alterações nas regiões anteriores (Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2008).

De entre as várias funções do fígado destacam-se:

- Desintoxicação de toxinas produzidas pelo organismo ou externas ao organismo;
- Destruição de hemácias e reaproveitamento dos seus constituintes (em conjunto com o baço);
- Síntese e secreção de bÍlis (secreção exócrina);

- Síntese de proteínas plasmáticas, incluindo os factores de coagulação;
- Síntese de lipoproteínas plasmáticas;
- Funções metabólicas, como por exemplo, síntese de glicogénio, gliconeogénese, armazenamento de glicogénio, algumas vitaminas e lípidos (Burkitt *et al.*, 1994).

Os hepatócitos são as células que formam cerca de 90% do volume celular do parênquima hepático e exibem uma polaridade definida. Esta é mantida por três zonas distintas na membrana, quer na morfologia como na sua função. A membrana apical é rica em microvilosidades e compreende cerca de 10-15% da área superficial da célula; a porção lisa lateral representa 15% da superfície e a membrana sinusoidal, também rica em microvilosidades, representa 70% da superfície celular (Figura 4) (Diaz, 2000). Os hepatócitos estão agrupados em camadas, cada uma com a espessura de uma única célula, que bifurcam e fundem-se estabelecendo redes complexas, através das quais se desenvolvem os capilares (sinusóides) hepáticos. Entre os hepatócitos correm pequenos canais ramificados, os canalículos biliares (Hinton and Grasso, 1995).

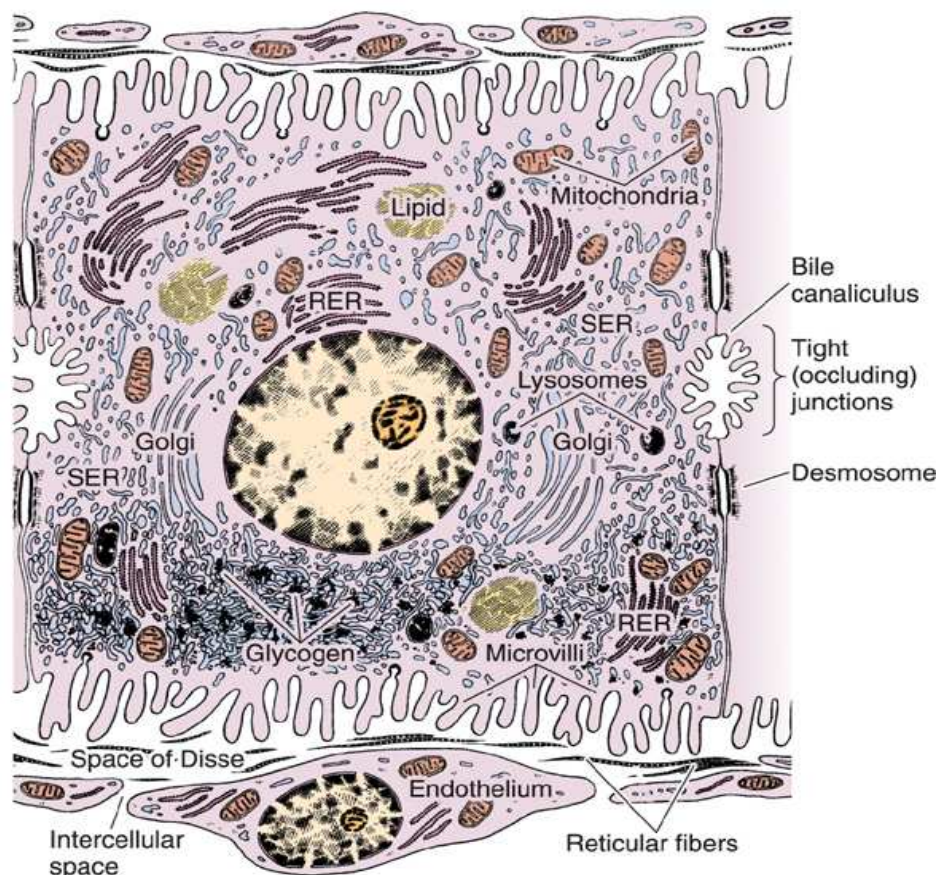


Figura 4 – Ultra estrutura do hepatócito. RER, retículo endoplasmático rugoso; SER, retículo endoplasmático liso X10000 (Junqueira e Carneiro, 2008).

Também estão presentes quatro tipos de células não parenquimatosas: células endoteliais, células de Küpffer, células Ito e linfócitos. (Hinton e Grasso, 1995; Puviani

et al., 1998). As células endoteliais que formam os sinusóides são fenestradas, permitindo uma livre troca de proteínas entre o sangue dos sinusóides e o espaço de Disse (espaço que se encontra entre as células endoteliais e os hepatócitos) (Hinton e Grasso, 1995). As células de Küpffer são células fagocitárias, arredondadas, e com núcleos ovóides. Pertencem ao sistema de defesa monócito-macrófago, participando também na remoção das hemácias envelhecidas e na produção de bilirrubina (Burkitt *et al.*, 1994).

I.4.1. O fígado como órgão de biotransformação

O fígado é o maior órgão metabólico, dado que muitas moléculas são catabolizadas por diversas enzimas. O processo pelo qual os endo- e xenobióticos são transformados de moléculas hidrofóbicas para moléculas hidrofílicas, de modo a facilitar a sua eliminação do corpo, é designado biotransformação (Sipes e Gandolfi, 1991; Parkinson, 1996).

A maior quantidade e diversidade de enzimas envolvidas na biotransformação encontram-se no fígado. As reacções metabolizadas por estas enzimas metabolisadoras de drogas estão divididas em dois grupos, chamados fase I e fase II. As reacções da fase I envolvem modificações químicas da molécula através de hidrólise, redução e oxidação. Estas reacções expõem ou introduzem um grupo funcional (-OH, -NH₂, -SH ou -COOH) e normalmente resultam num pequeno aumento da solubilidade na água. As reacções da fase II envolvem reacções biossintéticas onde os xenobióticos ou os metabolitos derivados da fase I são ligados covalentemente a uma molécula endógena, produzindo um conjugado (Figura 5) (Sipes e Gandolfi, 1991).

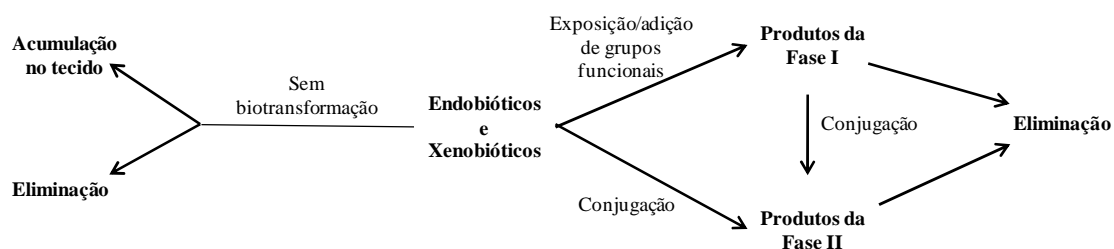


Figura 5 – Relação das reacções de biotransformação da fase I e fase II (Adaptado de Sipes e Gandolfi 1991).

A maior parte das reacções da fase II resultam no aumento da hidrofobicidade dos xenobióticos e promovem a excreção dos químicos estranhos na bÍlis e urina (Sipes e Gandolfi, 1991; Hinton e Grasso, 1995; Parkinson, 1996). O grupo de enzimas mais

importante e que está envolvido nas reacções da fase I é a do citocromo P-450 nas membranas do retículo endoplasmático. Este sistema é um sistema de enzimas acopladas, composto por duas enzimas: redutases NADPH-citocromo P-450 e a enzima contendo o grupo heme, normalmente referida como citocromo P-450. (Sipes e Gandolfi, 1991; Kedderis, 1996). De entre as diferentes enzimas da fase II, presentes principalmente no citoplasma, a glutathione S-transferase (GST) representa uma importante enzima de biotransformação para o fígado (Sipes e Gandolfi, 1991; Parkinson, 1996).

O metabolismo das drogas pode ser considerado como protector ou como processo desintoxicante uma vez que converte os compostos lipofílicos (cuja acumulação pode danificar as células) e xenobióticos activos em metabólitos inactivos solúveis em água e facilmente excretados (Sipes e Gandolfi, 1991; Hinton e Grasso, 1995; Kedderis, 1996). Como a transferência de electrões para as moléculas de oxigénio ocorre durante a sequência de reacções da fase I, as espécies reactivas de oxigénio (ROS) podem ocasionalmente dissociar-se do citocromo antes da oxidação do substrato, conduzindo ao stress oxidativo e a danos celulares (Haussinger, 1996). Os intermediários reactivos da bioactivação podem interagir com locais nucleofílicos no tecido. Esta interacção covalente com as macromoléculas dos tecidos deve ser o factor chave dos efeitos tóxicos produzidos pelos xenobióticos. Para muitos químicos, estes intermediários reactivos podem ser neutralizados sem causar efeitos celulares adversos, desde que haja um equilíbrio entre a taxa de formação e desintoxicação. Quando este balanço é perturbado, quer pelo aumento da produção de intermediários reactivos ou pela diminuição da capacidade de desintoxicação, a formação de metabólitos reactivos pode estar associada aos danos celulares (Sipes e Gandolfi, 1991).

Os danos no fígado são uma patologia comum, tanto os agudos como os crónicos, muitas vezes caracterizados na sua evolução crónica por um processo progressivo desde a esteatose até ao carcinoma hepatocelular, através de hepatite crónica, fibrose e cirrose (Loguercio e Federico, 2003; Vitaglione *et al.*, 2004). Estes processos envolvem a apoptose, necrose, inflamação, resposta imunitária, isquémia, expressão genética alterada e regeneração dos hepatócitos, células de Küpffer e endoteliais (Loguercio e Federico, 2003).

A nível celular (principalmente nos hepatócitos), os diferentes mecanismos bioquímicos e celulares dos danos celulares induzidos por químicos, podem, de acordo com Kedderis (1996), estar organizados em quatro categorias gerais: efeitos directos dos tóxicos, ligação covalente dos metabólitos reactivos, indução de stress oxidativo e alteração da homeostasia do cálcio. Por vezes podem operar diferentes mecanismos de acordo com as doses do tóxico. Por isso, não existe uma única causa para os danos e morte celular.

Muitas hepatotoxinas são metabolicamente activadas para metabolitos extremamente reactivos, através da acção das isoenzimas CYP, que se ligam a proteínas e afectam as funções celulares. Outra forma pela qual as hepatotoxinas podem induzir lesão celular hepática e morte é a geração de stress oxidativo, quer aumentando espécies reactivas, tais como ROS, e / ou diminuindo defesas celulares antioxidantes. Algumas espécies reactivas de oxigénio formadas pelas toxinas (ou mesmo metabolitos reactivos) podem iniciar a peroxidação lipídica que, por sua vez, por uma cascata de reacções, tornam-se mais reactivas. O stress oxidativo, além de ligações covalentes, também provoca a diminuição dos níveis celulares de glutathione, tendo elevadas implicações na sobrevivência celular (Kedderis, 1996).

Entre outros factores, o tipo de morte celular (necrose ou apoptose) pode depender da concentração do agente tóxico. Moderadas concentrações podem aparentemente induzir apoptose, enquanto que menores concentrações causam necrose. A necrose é causada por uma perda rápida da homeostasia celular, caracterizada pelo entumescimento celular, lise da membrana e libertação do conteúdo celular (Halliwell, 2009). Normalmente é uma consequência da profunda perda de função mitocondrial e consequente empobrecimento em ATP, traduzindo-se na perda da homeostase iónica e regulação do volume, com aumento do influxo de Ca^{2+} . A necrose é acompanhada por uma resposta inflamatória no tecido adjacente (Kedderis, 1996).

A apoptose envolve a diminuição do volume celular, a condensação da cromatina nuclear, bem como a fragmentação da célula em corpos apoptóticos com membranas plasmáticas intactas. Estes são rapidamente fagocitados por células vizinhas ou macrófagos. A apoptose está sob um controlo genético preciso, em que a síntese de RNA e de proteínas bem como a energia (ATP) são necessárias e a degradação das células ocorre de uma forma mais ordenada do que durante a necrose (Kedderis, 1996).

Há cada vez mais evidências de que ROS e RNS (espécies reactivas de nitrogénio) (e, por isso, stress oxidativo) têm um papel crucial nos vários passos que iniciam e regulam a progressão de doenças hepáticas, como as doenças alcoólicas do fígado, esteatose não alcoólica e hepatite tipo C independentemente do tipo de agente etiológico (Loguercio e Federico, 2003; Vitaglione *et al.*, 2004). Porque o stress oxidativo tem um papel central nas doenças do fígado, o uso de antioxidantes (tanto naturais como sintéticos) têm sido propostos como agentes terapêuticos, assim como coadjuvantes, para contrariar/neutralizar esses danos (Loguercio e Federico, 2003; Vitaglione *et al.*, 2004).

I.5. O baço

O baço é um grande órgão linfóide situado na parte superior esquerda do abdómen. Possui duas funções principais: produção de respostas imunitárias, uma vez que é um órgão de produção de linfócitos activados, e a remoção da circulação de partículas e células sanguíneas envelhecidas, particularmente hemácias (Burkitt *et al.*, 1994). Apesar do baço exercer importantes funções no organismo, não é essencial para a vida. Em pacientes cujo baço foi removido, o fígado, por exemplo, pode substituir algumas dessas funções, mas o risco de infecção é maior (Junqueira e Carneiro, 2008).

O baço (Figura 6) é caracterizado por uma polpa esplénica ou parênquima, dividida parcialmente por trabéculas que resultam da cápsula de tecido conjuntivo denso que rodeia o baço. No parênquima distinguem-se duas zonas, a polpa branca e a vermelha. A primeira consiste numa camada linfática periarterial e em nódulos linfóides. Como no tecido linfóide em geral, encontram-se células e fibras reticulares, que formam uma trama tridimensional, cujos espaços são ocupados principalmente por linfócitos em vários estágios de maturação. A polpa vermelha é constituída por cordões esplénicos e sinusóides sanguíneos. Os cordões esplénicos contêm linfócitos T e B, macrófagos e muitas células sanguíneas e estão separados irregularmente por sinusóides (Junqueira e Carneiro, 2008).

O baço é irrigado através de uma única artéria, a artéria esplénica, e é drenado pela veia esplénica (Burkitt *et al.*, 1994). A artéria esplénica ramifica-se em artérias trabeculares de vários calibres ao longo do tecido conjuntivo trabecular da polpa branca. Quando abandonam as trabéculas para entrarem no parênquima, são imediatamente envolvidas por linfócitos T. Estes vasos são conhecidos por artérias centrais ou artérias da polpa

branca. Quando a polpa branca forma um nódulo linfático, a artéria passa a arteríola, e ocupa uma posição central. Ramifica-se lateralmente e irriga todo o tecido linfóide que a rodeia. Antes de deixar o tecido linfóide da polpa branca, ramificações da arteríola atingem a polpa vermelha onde irão libertar sangue para os sinusóides. Destes, o sangue passa para as veias da polpa vermelha que se reúnem formando as veias trabeculares (Junqueira e Carneiro, 2008).

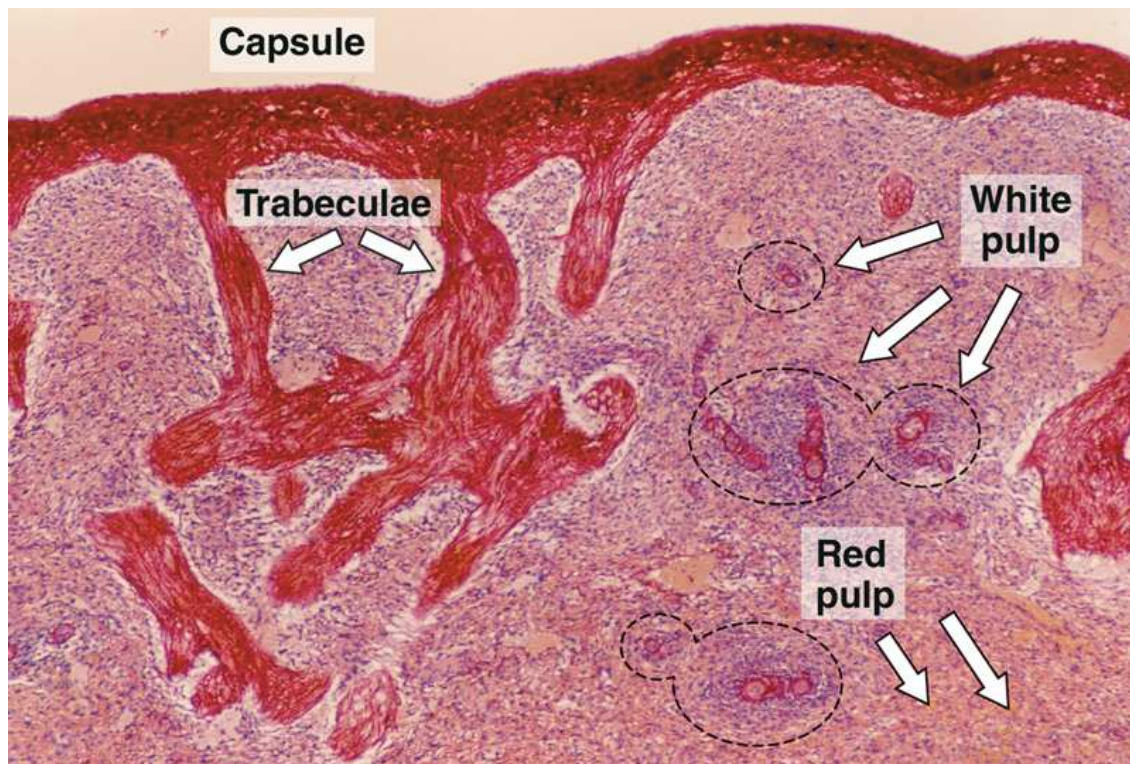


Figura 6 – Secção do baço observando-se as trabéculas emitidas pela cápsula e a organização das duas polpas (Junqueira e Carneiro, 2008).

I.6. O rim

O principal órgão do sistema urinário é o rim, cujas funções principais incluem a regulação do volume, composição, pH e pressão do sangue e contribui para a regulação do metabolismo através da síntese de hormonas (Junqueira e Carneiro, 2008).

O rim é constituído por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, uma zona cortical e uma zona medular. A zona medular é constituída por 10 a 18 estruturas piramidais – pirâmides medulares, cujas bases e lados entram em contacto com a zona cortical. A zona cortical (Figura 7) é contínua e ocupa o espaço deixado pelas pirâmides medulares (Junqueira e Carneiro, 2008).

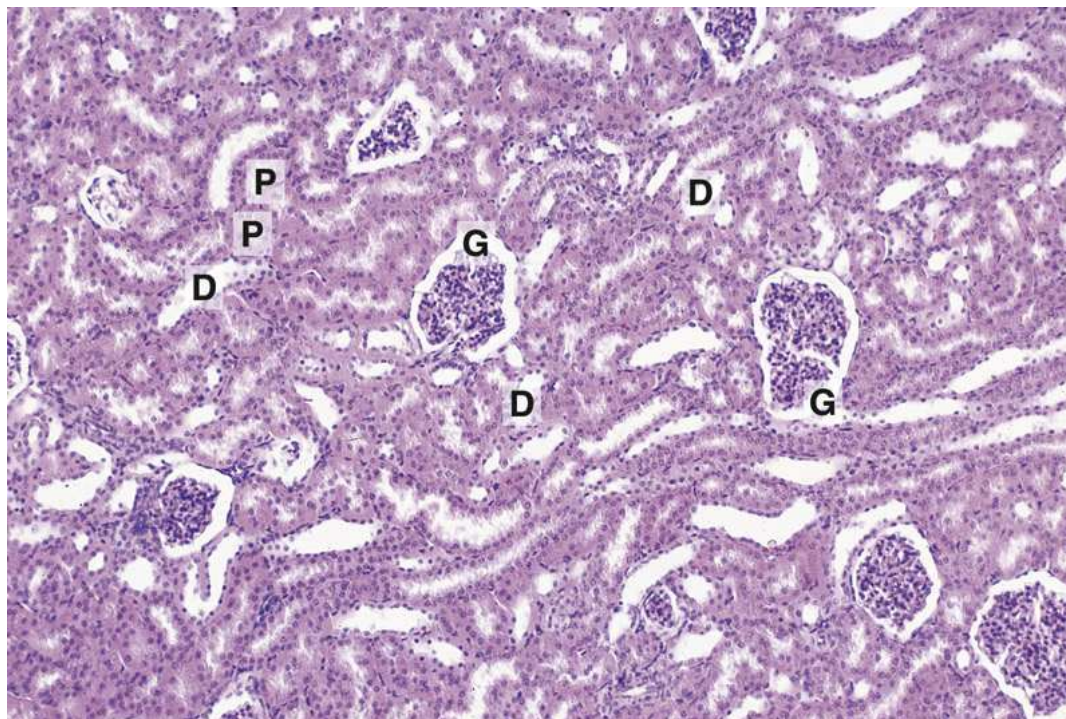


Figura 7 – Secção do córtex renal, composto principalmente por túbulos contornados proximais (P), distais (D) e glomérulos renais (G) (Junqueira e Carneiro, 2008).

As unidades funcionais do rim são os nefrónios. Cada nefrónio é constituído pelo corpúsculo renal, túbulo contornado proximal, ança de Henle, túbulo contornado distal e tubo colector (Junqueira e Carneiro, 2008). Cada rim apresenta cerca de um a quatro milhões de nefrónios que realizam a osmorregulação e excreção de vários resíduos metabólicos tóxicos através dos seguintes processos: filtração, reabsorção selectiva e secreção (Burkitt *et al.*, 1994). A filtração ocorre ao nível corpúsculo renal, onde substâncias presentes no sangue e de baixo peso molecular atravessam a parede dos capilares do glomérulo de Malpighi para o túbulo renal. À medida que o fluido se desloca ao longo do túbulo renal, muitas substâncias úteis são reabsorvidas para a corrente sanguínea, enquanto que outras (substâncias tóxicas e em excesso no organismo) são secretadas das células dos túbulos e do sangue para o filtrado (Junqueira e Carneiro, 2008).

O rim é um órgão susceptível a danos causados por agentes tóxicos. Existe uma grande variedade de drogas, químicos ambientais e metais que podem causar nefrotoxicidade, incluindo o CCl_4 . A susceptibilidade pouco comum do rim dos mamíferos a agentes tóxicos pode ser atribuída em parte à particular fisiologia e anatomia deste órgão. Qualquer químico ou droga que se encontre na circulação sanguínea irá passar pelos rins em quantidades relativamente altas e o transporte renal, a acumulação e o

metabolismo desses xenobióticos contribuem significativamente para a susceptibilidade do rim (Schnellmann, 1996).

I.7 Enquadramento do trabalho e objectivos

Grande parte de população mundial continua a depender de plantas medicinais para os seus cuidados primários de saúde.

As plantas medicinais contêm substâncias bioactivas com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas. Existe um grande número de espécies em todo o mundo, usadas desde tempos pré-históricos na medicina popular dos diversos povos. Contudo, muitas delas podem ser venenosas ou tóxicas quando usadas em doses elevadas.

O uso de plantas com fins medicinais e alimentares, neste último caso principalmente como condimento, também é parte integrante da cultura portuguesa. As plantas medicinais são utilizadas devido às suas propriedades terapêuticas no tratamento de vários problemas de saúde, tais como constipações, alergias, artrites e insónias. Podem actuar como anti-inflamatórios, diuréticos, digestivos, entre outros. Assim, torna-se necessário conhecer os verdadeiros efeitos no organismo humano das plantas utilizadas, quer a nível medicinal, quer como condimentos alimentares.

Na literatura já estão documentados muitos estudos realizados com plantas medicinais de vários países, principalmente africanos e asiáticos, utilizando os mais variados órgãos das plantas. A planta escolhida para este trabalho, *Pterospartum tridentatum*, é usada em Portugal para fins medicinais e também na culinária tradicional. Por esta razão, já se realizaram estudos sobre a sua composição em óleos essenciais (Grosso *et al.*, 2007), sobre a acção de flavonóides de extractos de *P. tridentatum* como agentes protectores de células endoteliais contra danos oxidativos (Vítor *et al.*, 2004) e sobre os efeitos opostos dos flavonóides isoquercitrina e sissotrina nos níveis de glucose no sangue de ratinhos (Paulo *et al.*, 2008). Dada a escassa bibliografia disponível sobre estudos *in vivo* em ratinhos, o efeito de extractos de *P. tridentatum* em diversos órgãos e a real capacidade protectora destes extractos, surgiu este trabalho com o objectivo de melhor compreender o efeito dos vários constituintes químicos desta planta no ratinho. As flores desta planta são frequentes em infusões e por isso este trabalho incidiu no estudo dos efeitos histopatológicos de extractos de folhas e flores de *P. tridentatum* no

fígado, baço e rim de ratinhos e da sua acção protectora após a administração de um tóxico, o CCl_4 .

Capítulo II

Material e Métodos

II. Material e Métodos

II.1. Preparação dos extractos

Efectuaram-se colheitas de exemplares selvagens de *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk, a 16 de Fevereiro de 2008, na zona de Castelo de Paiva (Norte de Portugal). Posteriormente, a 19 de Abril de 2008, procedeu-se a nova colheita de exemplares da mesma população, com o objectivo de recolha das flores da referida espécie.

Foram preparados dois tipos de extractos, um de folhas e outro de flores, segundo o processo descrito por Amida *et al.* (2007). Após a colheita do material vegetal, procedeu-se a uma breve lavagem em água corrente, sendo a última passagem por água destilada. Tanto as folhas como as flores foram colocadas num compartimento, à temperatura ambiente, até completa secagem.

- Extracto de folhas

Foram cortados pequenos fragmentos (cerca de 25 mm²) de folhas de *P. tridentatum*. Ferveu-se durante 2 horas cerca de 100g da planta em 2,5L de água destilada. A solução ficou em repouso durante 24 horas, procedendo-se à decantação e filtração através de gaze. O filtrado (cerca de 1,3L) foi distribuído por vários cadinhos (15ml cada). Estes foram colocados numa estufa a 40°C até à obtenção do extracto seco ($\pm 0,178$ g de extracto por cadinho).

- Extracto de flores

Repetiu-se o mesmo procedimento para as flores. As flores de *P. tridentatum* foram pesadas e fervidas cerca de 85g em 2,125L de água destilada, durante 2 horas. O filtrado obtido, cerca de 1,2L, foi distribuído por vários cadinhos, obtendo-se uma média de 0,157g de extracto de flores por cadinho.

- Preparação das soluções de extracto de folhas e flores

Para a realização dos estudos de toxicidade *in vivo* prepararam-se soluções de extracto de folhas e de flores nas concentrações de 10, 100 e 1000 mg por kg de peso de ratinho, em solução salina (NaCl a 0,9%).

Nos estudos de protecção *in vivo*, e de acordo com os resultados histopatológicos obtidos no estudo de toxicidade prepararam-se soluções de extracto de folhas e de flores nas concentrações de 5 e 10 mg por kg de peso de ratinho, em solução salina (NaCl a 0,9%) uma vez que na concentração de 10 mg de extracto, apesar de ocorrerem lesões, estas são em menor número. A solução de tetracloreto de carbono (CCl₄) à concentração de 2 ml por kg de peso vivo de ratinho, seleccionada de acordo com a síntese de Janakat (2002) foi preparada usando como solvente o azeite. O volume administrado da solução de CCl₄ foi de 0,14 ml por ratinho. O volume administrado de cada uma das soluções de extracto, por ratinho, foi de cerca de 0,4 ml, estando directa e proporcionalmente relacionado com o peso de cada animal.

Os animais utilizados, ratinhos machos CD1 da estirpe ICR, com cerca de 7 semanas, pesando entre 31 e 40g, foram fornecidos por Charles River Laboratories (L'Arbresle, França). Seguiu-se um período de aclimatização de 4 dias às condições do biotério do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, durante o qual os ratinhos foram mantidos em gaiolas de policarbonato transparente, numa câmara climatizada (22° ± 2°C, fotoperíodo luz/escuridão de 12/12 horas e humidade relativa 40-60%), em conformidade com as directivas comunitárias respeitantes ao acondicionamento temporário de pequenos mamíferos (Decreto-Lei n.º 129/92, de 23 de Outubro). Os animais tiveram acesso a água e ração apropriada *ad libitum*. A ração foi fornecida pela Scientific Animal Food and Engineering (SAFE) (Augy, França).

II.2. Protocolo experimental de administração dos compostos em estudo

A experiência foi dividida em duas partes: a primeira com o objectivo de estudar a possível toxicidade dos extractos das folhas e das flores de *P. tridentatum* e a segunda com vista a estudar a capacidade protectora desses mesmos extractos.

No estudo da toxicidade, os animais foram previamente pesados e divididos em 6 grupos: o grupo controlo negativo (NaCl 0,9%) 4 grupos experimentais (Tabela 2).

Todos os animais de cada grupo foram submetidos a uma injeção diária, por via subcutânea, de extractos de folhas ou de flores, durante o mesmo período de exposição.

Tabela 2 - Protocolo experimental do estudo de toxicidade.

	Grupos de ratinhos	Número de ratinhos por grupo	Soluções administradas	Tempo de exposição (dias)
	Controlo Negativo	3	NaCl (0,9%)	6
Extracto de Folhas	Grupo I	4	10 mg de extracto de folhas/kg de peso vivo	6
	Grupo II	4	100 mg de extracto de folhas/kg de peso vivo	6
	Grupo III	4	1000 mg de extracto de folhas/kg de peso vivo	6
Extracto de Flores	Grupo IV	4	10 mg de extracto de flores/kg de peso vivo	6
	Grupo V	4	100 mg de extracto de flores/kg de peso vivo	6
	Grupo VI	4	1000 mg de extracto de flores/kg de peso vivo	6

No estudo de protecção, os animais foram previamente pesados e divididos em 5 grupos: o grupo controlo positivo (CCl_4) e 4 grupos experimentais. As experiências foram realizadas tendo presentes as linhas de orientação de “Princípios de la Ciência Animal de Laboratório” (van Zutphen, Baumans and Beynen, 1999).

No estudo de protecção, os animais do grupo controlo positivo foram injectados, por via subcutânea, com 0,1 ml de solução de CCl_4 na concentração de 2 ml por kg de peso de ratinho no primeiro dia de ensaio e uma segunda injeção 72 horas depois. Os animais dos grupos VII, VIII, IX e X também foram submetidos a uma injeção diária, por via subcutânea, de extracto de folhas ou de flores, durante o mesmo período de exposição de 10 dias. Estes mesmos animais foram ainda submetidos a duas injeções subcutâneas

de 0,14 ml de CCl_4 à concentração de 2 ml por kg de peso de ratinho no oitavo dia de ensaio e 72 horas depois (Tabela 3).

Tabela 3 - Protocolo experimental do estudo de protecção.

	Grupos de ratinhos	Número de ratinhos por grupo	Soluções administradas	Tempo de exposição (dias)
	Controlo Positivo	5	2 ml de CCl_4 por kg de peso de ratinho	10
Extracto de Folhas	Grupo VII	5	5 mg de extracto de folhas/kg de peso vivo + 2 ml de CCl_4 / kg de peso vivo	10
	Grupo VIII	5	10 mg de extracto de folhas/kg de peso vivo + 2 ml de CCl_4 /kg de peso vivo	10
Extracto de Flores	Grupo IX	5	5 mg de extracto de flores/ kg de peso vivo + 2 ml de CCl_4 /kg de peso vivo	10
	Grupo X	5	10 mg de extracto de flores/kg de peso vivo + 2 ml de CCl_4 /kg de peso vivo	10

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 24 horas após a última injeção. Após abertura da cavidade abdominal e observação macroscópica dos órgãos, removeu-se o fígado, os rins e o baço. Estes foram pesados numa balança AND modelo K0001 e imediatamente preparados para estudos histológicos, tal como a seguir se descreve.

II.3.Preparação das amostras para Histologia

Para as análises de microscopia óptica recolheram-se pequenos fragmentos de cada um dos órgãos atrás referidos e procedeu-se ao seguinte tratamento:

- Fixação/Desidratação

	Tempo de exposição
Solução de “Bouin”	24 horas
Etanol a 70°	24 horas
Etanol a 90°	1 hora
Etanol a 100°	1 hora
Etanol a 100°	30 minutos
Etanol a 100°: Benzol (1:1)	30 minutos
Benzol puro	1 hora e trinta minutos

- Impregnação

	Tempo de exposição
Benzol + aparas de parafina (p.f. 42°-44°C)	30 minutos à temperatura ambiente e 1 hora na estufa a 40°C
Parafina (p.f. 42°-44°C)	1 hora na estufa a 60°C
Parafina (p.f. 56°-58°C)	30 minutos na estufa a 60°C

Procedeu-se à inclusão dos fragmentos em parafina (p.f. 56°-58°C), utilizando-se moldes de plástico. Efectuaram-se cortes de 5-7 µm de espessura, no micrótomo Leitz 1512, utilizando-se lâminas metálicas descartáveis Leica-Modelo 819. Os cortes foram montados em água albuminada sobre lâminas de vidro e levados à estufa a 40°C para secagem, durante dois dias. De seguida efectuou-se a coloração das lâminas com hematoxilina e eosina, obedecendo ao seguinte procedimento:

- Desparafinação/Re-hidratação

	Tempo de exposição
Xilol	10 minutos
Etanol a 100°	5 minutos
Etanol a 95°	5 minutos
Etanol a 75°	5 minutos
Etanol a 50°	5 minutos
Água corrente	30 minutos

- Coloração

	Tempo de exposição
Hematoxilina	15 minutos
Água corrente	15 minutos
Eosina-phloxina	2 minutos

- Desidratação/Clareamento

	Tempo de exposição
Etanol a 95°	Passagem por duas tinas
Etanol a 100°	30 segundos
Xilol	Passagem por duas tinas

As preparações foram montadas, utilizando o meio EUKITT (Eukitt K) e observadas ao microscópio óptico Olympus modelo BX41TF com sistema fotográfico acoplado FD-35DX para obtenção de fotografias dos aspectos considerados mais relevantes para este trabalho.

II.4. Análise estatística

Os resultados dos rácios dos vários órgãos apresentam-se sob a forma de médias \pm erros padrão, para o número de animais referido para cada determinação.

Os dados foram tratados com o programa SIGMASTAT, submetendo-os aos testes ONE WAY ANOVA (SigmaStat for Windows Version 3.5, SPSS Inc., USA) para estabelecer uma comparação e Teste de Tukey para analisar as diferenças possíveis entre os vários grupos. Estabeleceu-se como nível de significado estatístico $p \leq 0,05$.

Capítulo III

Resultados

III.1 Sobrevivência e comportamento dos animais

Ao longo do presente trabalho observou-se uma taxa de sobrevivência de 100%. A análise do comportamento dos animais durante os estudos de toxicidade e de protecção, comparando com o grupo controlo negativo (NaCl 0,9%), revelou uma hiperactividade nos animais dos diversos grupos, à medida que os tratamentos prosseguiam.

III.2 Aspecto macroscópico dos órgãos

Relativamente aos estudos de toxicidade e por comparação com o grupo controlo negativo, não se detectaram alterações significativas no fígado e baço dos animais, com excepção do rim direito e esquerdo de um ratinho do grupo I (10 mg/kg de extracto de folhas) e de um ratinho do grupo VI (1000 mg/kg de extracto de flores) que apresentavam uma coloração amarelada com nítidas hemorragias.

Nos estudos de protecção não se detectaram alterações macroscópicas significativas com excepção do grupo controlo positivo (CCl₄) em que os rins e o fígado apresentavam coloração amarelada, hemorragias e fragilidade ao toque.

III.3 Análise da massa dos ratinhos e respectivos órgãos

O peso dos ratinhos aumentou em todos os grupos ao longo dos vários tratamentos efectuados, com excepção do grupo controlo positivo (CCl₄), em que se observou a diminuição da massa final média em 2,114 g, comparando com a inicial.

No estudo da toxicidade das folhas observou-se um aumento significativo da massa média do baço dos ratinhos do grupo I, assim como uma diminuição significativa da massa média do rim esquerdo dos ratinhos do grupo II (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise estatística dos rácios dos órgãos no estudo de toxicidade dos extractos de folhas.

	Controlo Negativo	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Fígado	0,0580±0,00188	0,0639±0,00363	0,0532±0,00179	0,0560±0,00190
Baço	0,00299±0,000281	0,00513±0,000769*	0,00276±0,0000196	0,00312±0,000187
Rim esquerdo	0,00902±0,000385	0,00921±0,000415	0,00734±0,000426*	0,00874±0,000126
Rim direito	0,00898±0,000266	0,00914±0,000313	0,00751±0,000739	0,00876±0,000342

Nota: Os valores correspondem à média ± erro padrão com n = 3 para o grupo controlo e n=4 para os outros grupos. * Significativamente diferente do grupo controlo negativo ($P \leq 0,05$).

No estudo da toxicidade das flores observou-se uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) nos valores dos rácios do fígado e baço do grupo IV, apresentando estes órgãos uma massa média superior à massa média do grupo controlo negativo (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise estatística dos rácios dos órgãos no estudo de toxicidade dos extractos de flores.

	Controlo Negativo	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Fígado	0,0580±0,00188	0,0679±0,00332*	0,0575±0,00137	0,0589±0,00176
Baço	0,00299±0,000281	0,00477±0,000528*	0,0024±0,0001	0,00316±0,000296
Rim esquerdo	0,00902±0,000385	0,00721±0,000409	0,00688±0,000406	0,00765±0,000695
Rim direito	0,00898±0,000266	0,00769±0,000171	0,00713±0,000442	0,00775±0,000787

Nota: Os valores correspondem à média ± erro padrão com n = 3 para o grupo controlo e n=4 para os outros grupos. * Significativamente diferente do grupo controlo negativo ($P \leq 0,05$).

Relativamente aos estudos de protecção utilizando extractos de folhas, observaram-se diferenças significativas ($P \leq 0,05$), comparando com o grupo controlo negativo, nos rácios do baço, rim esquerdo e direito do grupo controlo positivo e do rim esquerdo do grupo VII, devido à diminuição da massa média destes órgãos. Comparando com o grupo controlo positivo, observaram-se diferenças significativas ($P \leq 0,001$) no rácio do baço do grupo VII e nos rins esquerdo e direito dos grupos VII e VIII, cuja massa média diminuiu ao contrário do que seria de esperar (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise estatística dos rácios dos órgãos no estudo de protecção com extractos de folhas.

	Controlo Negativo	Controlo Positivo	Grupo VII	Grupo VIII
Fígado	0,0580±0,00188	0,0643±0,00372	0,0621±0,00323	0,0646±0,00273
Baço	0,00299±0,000281	0,00224±0,000272*	0,00262±0,000164	0,00322±0,000231•
Rim esquerdo	0,00902±0,000385	0,0124±0,000630*	0,00812±0,000618*•	0,00881±0,0006•
Rim direito	0,00898±0,000266	0,0129±0,000835*	0,00827±0,0005•	0,0091±0,000707•

Nota: Os valores correspondem à média ± erro padrão com n = 3 para o grupo controlo e n=5 para os outros grupos. * Significativamente diferente do grupo controlo negativo ($P \leq 0,05$). • Significativamente diferente do grupo controlo positivo ($P \leq 0,001$).

Analisando os valores de rácios obtidos (Tabela 7) no estudo de protecção com flores, observaram-se diferenças significativas ($P \leq 0,05$) no baço do grupo IX, no rim esquerdo e direito do grupo controlo positivo e do grupo X, quando comparados com o grupo controlo negativo. Comparando os grupos IX e X com o grupo controlo positivo, verificaram-se diferenças significativas ($P \leq 0,001$) no baço, cuja massa média aumentou, e no rim esquerdo e direito cuja massa média diminuiu, ao contrário do que seria de esperar.

Tabela 7 - Análise estatística dos rácios dos órgãos no estudo protecção com extractos de flores.

	Controlo Negativo	Controlo Positivo	Grupo IX	Grupo X
Fígado	0,0580±0,00188	0,0643±0,00372	0,0597±0,000936	0,0583±0,00234
Baço	0,00299±0,000281	0,00224±0,000272	0,0033±0,000135*•	0,00305±0,000207•
Rim esquerdo	0,00902±0,000385	0,0124±0,000630*	0,00841±0,000255•	0,00747±0,000280*•
Rim direito	0,00898±0,000266	0,0129±0,000835*	0,00895±0,000261•	0,00775±0,000212*•

Nota: Os valores correspondem à média ± erro padrão com n = 3 para o grupo controlo e n=5 para os outros grupos. * Significativamente diferente do grupo controlo negativo ($P \leq 0,05$). • Significativamente diferente do grupo controlo positivo ($P \leq 0,001$).

III.4 Alterações Histopatológicas

Foram analisados os efeitos histopatológicos de diferentes concentrações de extractos de folhas e flores de *Pterospartum tridentatum*. Tal como atrás se referiu, analisaram-se os efeitos protectores, a nível histológico, de algumas concentrações destes mesmos extractos após a administração de CCl₄.

III.4.1. Alterações histopatológicas no fígado

As secções de fígado do grupo de controlo negativo não revelaram alterações histopatológicas. Os hepatócitos conservaram a sua estrutura típica. Pelo contrário, os grupos tratados com extractos de folhas e flores de *P. tridentatum* nas concentrações mais elevadas, grupos III e VI, apresentaram alterações significativas, principalmente a nível da vacuolização dos hepatócitos.

A Tabela 8 resume as alterações hepáticas verificadas nos animais sujeitos aos vários tratamentos de toxicidade. As figuras 8 e 9 ilustram as principais alterações histológicas.

Tabela 8 - Principais alterações histológicas observadas no fígado de ratinhos nos tratamentos de toxicidade.

Alterações Histológicas	Grupo / Tratamento experimental						
	C	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Hipertrofia dos hepatócitos na zona centrolobular	-	+	++	++	+	++	++
Vacuolização dos hepatócitos	-	+	++	+++	+	++	+++
Desorganização do parênquima hepático	-	+	++	+++	++	++	+++
Hemorragias	+	+	++	++	+	++	++

(-) ausência em todas as lâminas; (+) presente em menos de 25% das lâminas;

(++) presente em 25% a 75% das lâminas; (+++) presente em mais de 75% das lâminas. C: grupo controlo negativo.

O fígado dos animais tratados com extractos de folhas de *P. tridentatum* apresenta os núcleos dos hepatócitos muito escuros (figura 8 b), característicos de apoptose; perda dos característicos cordões de hepatócitos e vacuolização (Figura 8 c); hipertrofia de alguns hepatócitos e depleção celular (Figura 8 d).

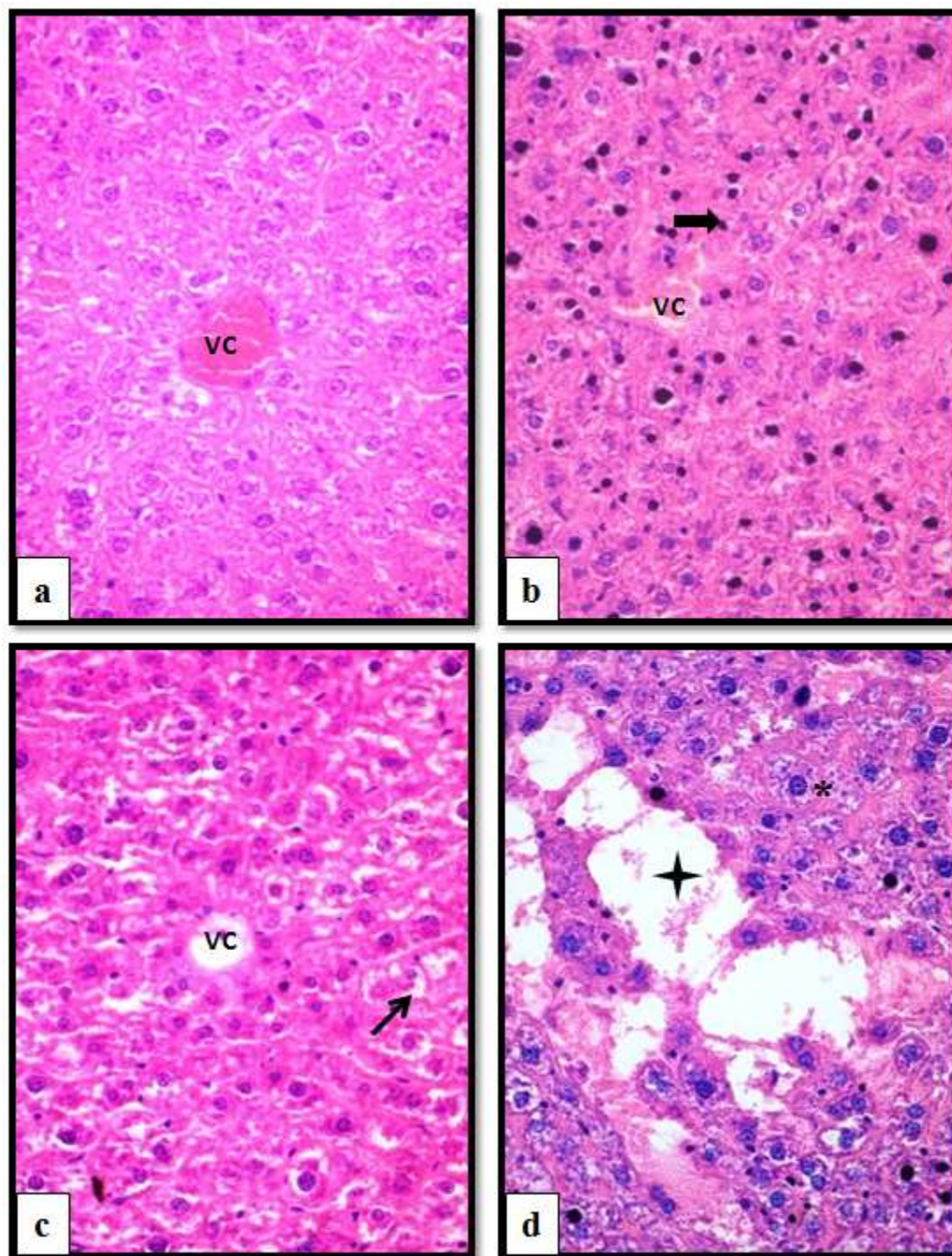


Figura 8 – Cortes histológicos do fígado (HE x400):

(a) – controlo NaCl; (b) – 10 mg/kg de extracto de folhas; (c) – 100 mg/kg de extracto de folhas; (d) – 1000 mg/kg de extracto de folhas.

↗ - vacuolização; ➡ - apoptose; ★ - depleção celular; * - hipertrofia

O fígado dos animais tratados com extractos de flores de *P. tridentatum* apresenta perda dos característicos cordões de hepatócitos (Figura 9 b); perda dos característicos cordões de hepatócitos, vacuolização e depleção celular (Figura 9 c); perda dos característicos cordões de hepatócitos, vacuolização e alguns núcleos celulares escuros, característicos de apoptose (Figura 9 d).

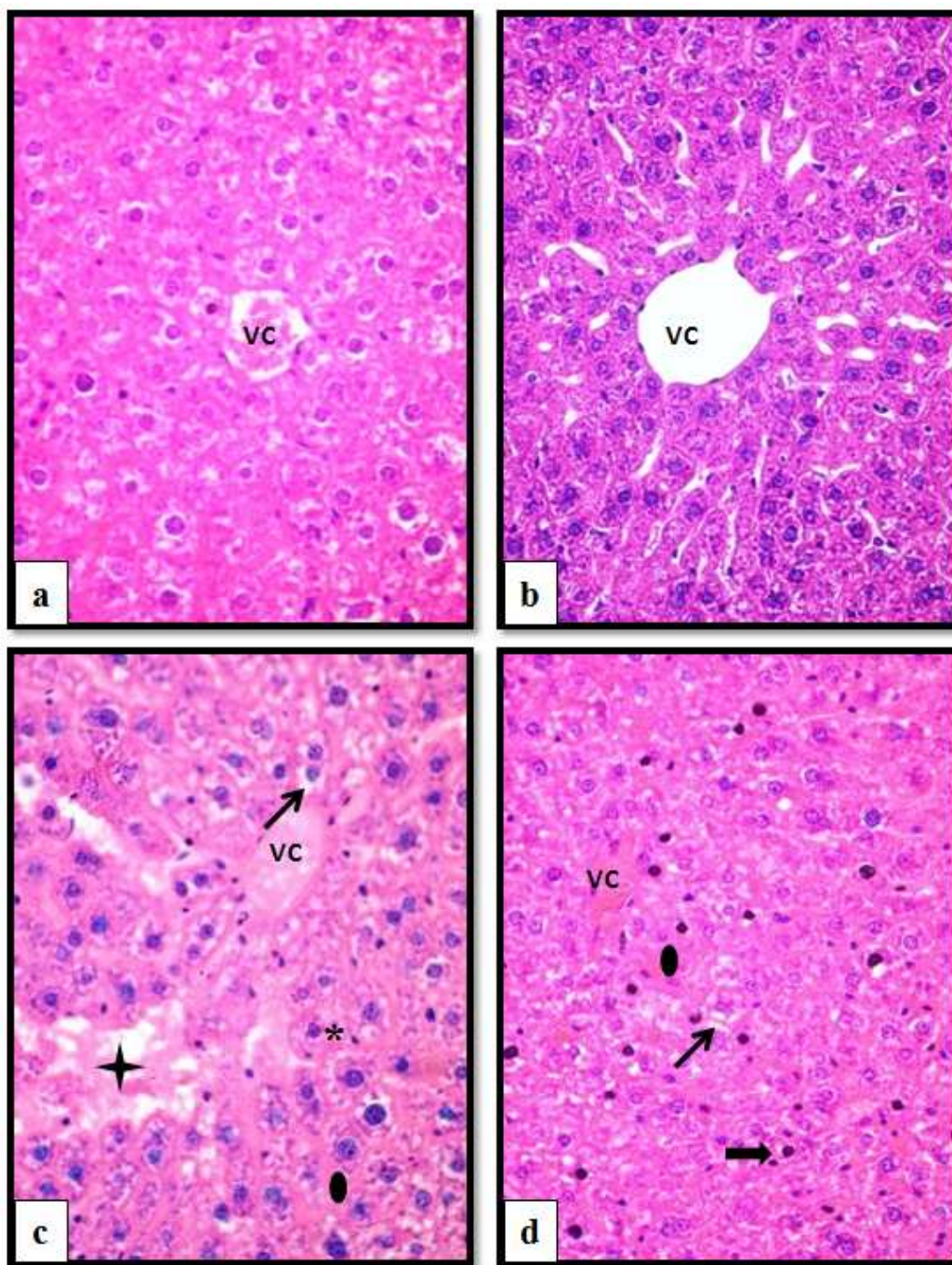


Figura 9 – Cortes histológicos do fígado (HE x400):

(a) – controlo NaCl; (b) – 10 mg/kg de extracto de flores; (c) – 100 mg/kg de extracto de flores; (d) – 1000 mg/kg de extracto de flores.

↗ - vacuolização; ➡ apoptose; ✦ - depleção celular; ● - hemorragias;

* - hipertrofia

O fígado dos animais tratados com CCl₄ apresenta perda dos característicos cordões de hepatócitos, extensas hemorragias em torno da veia central, hepatócitos vacuolizados e degenerescência celular (Figura 10 b); o fígado dos animais tratados com CCl₄ e extractos de folhas de *P. tridentatum* apresenta alguma melhoria quando comparado com o grupo CCl₄, embora com perda dos característicos cordões de hepatócitos, hemorragias e vacuolização (Figura 10 c); o fígado dos animais tratados com CCl₄ e extractos de flores de *P. tridentatum* apresenta perda dos característicos cordões de hepatócitos, vacuolização e algumas infiltrações de células de resposta inflamatória (Figura 10 e) enquanto que em f observa-se menor vacuolização dos hepatócitos.

Tabela 9 - Principais alterações histológicas observadas no fígado de ratinhos nos tratamentos de protecção.

Alterações Histológicas	Grupo / Tratamento experimental				
	CCl ₄	Grupo VII	Grupo VIII	Grupo IX	Grupo X
Hipertrofia dos hepatócitos na zona centrolobular	+++	++	++	++	++
Vacuolização dos hepatócitos	+++	++	+++	+++	++
Desorganização do parênquima hepático	+++	++	+++	++	+++
Hemorragias	+++	++	++	++	++

(-) ausência em todas as lâminas; (+) presente em menos de 25% das lâminas; (++) presente em 25% a 75% das lâminas; (+++) presente em mais de 75% das lâminas. CCl₄: grupo controlo positivo.

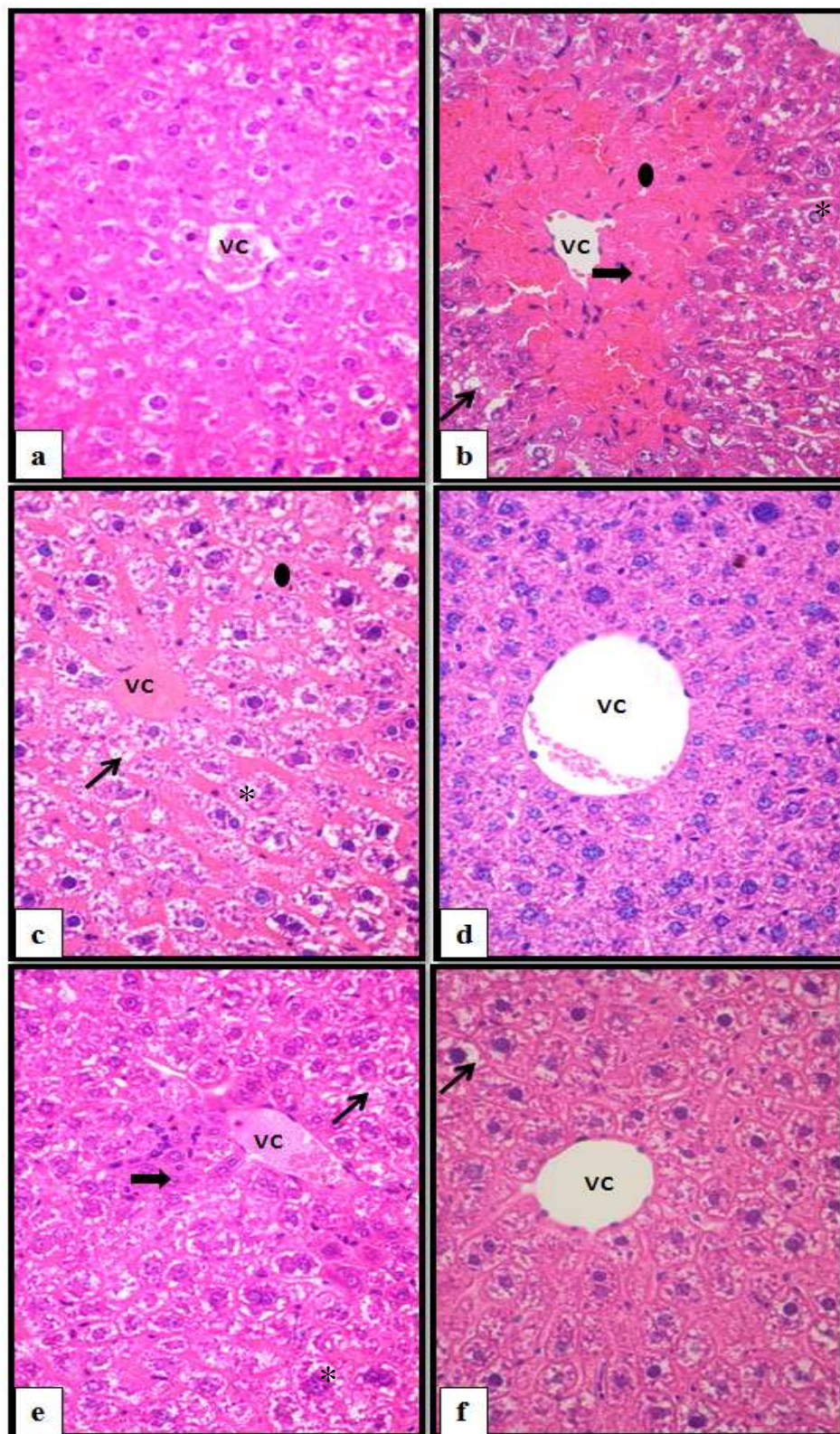


Figura 10 – Cortes histológicos do fígado (HE x400):

(a) – controlo NaCl; (b) – CCl_4 ; (c) – CCl_4 + 5 mg/kg de extracto de folhas; (d) – CCl_4 + 10 mg/kg de extracto de folhas; (e) – CCl_4 + 5 mg/kg de extracto de flores; (f) – CCl_4 + 10 mg/kg de extracto de flores.

↗ - vacuolização; ➡ - apoptose; ● - hemorragias; * - hipertrofia; vc – veia central.

III.4.2. Alterações histopatológicas no baço

As secções de baço de animais do controlo negativo não revelaram alterações morfológicas. No entanto, os vários grupos do estudo de toxicidade dos extractos de *P. tridentatum* evidenciaram alterações histológicas (Tabela 10) como a intensa desorganização das polpas nos grupos II e III e o aumento do número de macrófagos em todos os grupos, com excepção do grupo II.

Tabela 10 - Principais alterações histológicas observadas no baço de ratinhos nos tratamentos de toxicidade.

Alterações Histológicas	Grupo / Tratamento experimental						
	C	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Desorganização das polpas	-	++	+++	+++	+	++	++
Aumento dos espaços intercelulares	-	-	++	+	-	-	+
Aumento do n.º de macrófagos	-	++	-	++	++	++	++

(-) ausência em todas as lâminas; (+) presente em menos de 25% das lâminas; (++) presente em 25% a 75% das lâminas; (+++) presente em mais de 75% das lâminas. C: grupo controlo negativo.

O baço dos animais tratados com extractos de folhas de *P. tridentatum* apresenta desorganização das polpas e um ligeiro aumento do número de células fagocíticas (Figura 11 b e d). Para além disso observam-se zonas de depleção celular (Figura 11 c).

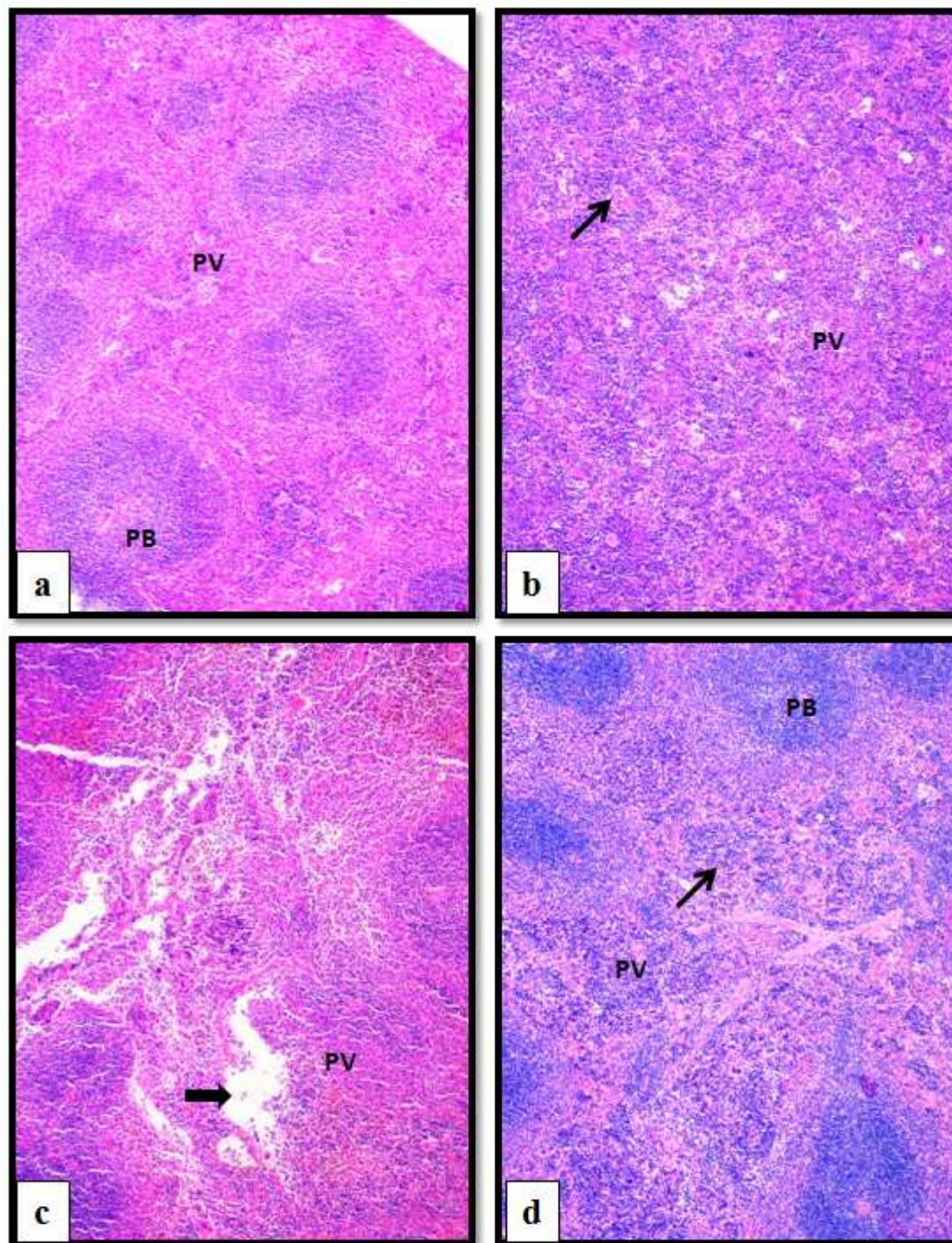


Figura 11 – Cortes histológicos do baço (HE) (x100):

(a) – controlo NaCl; (b) – 10 mg/kg de extracto de folhas; (c) – 100 mg/kg de extracto de folhas; (d) – 1000 mg/kg de extracto de folhas.

↗ - macrófagos; ➡ - depleção celular; PB – Polpa Branca; PV – Polpa vermelha

O baço dos animais tratados com extractos de flores de *P. tridentatum* apresenta desorganização das polpas e um ligeiro aumento do número de células fagocíticas (Figuras 12 b, c e d). Também é possível observar ligeiras e esporádicas hemorragias (Figuras 12 b e d).

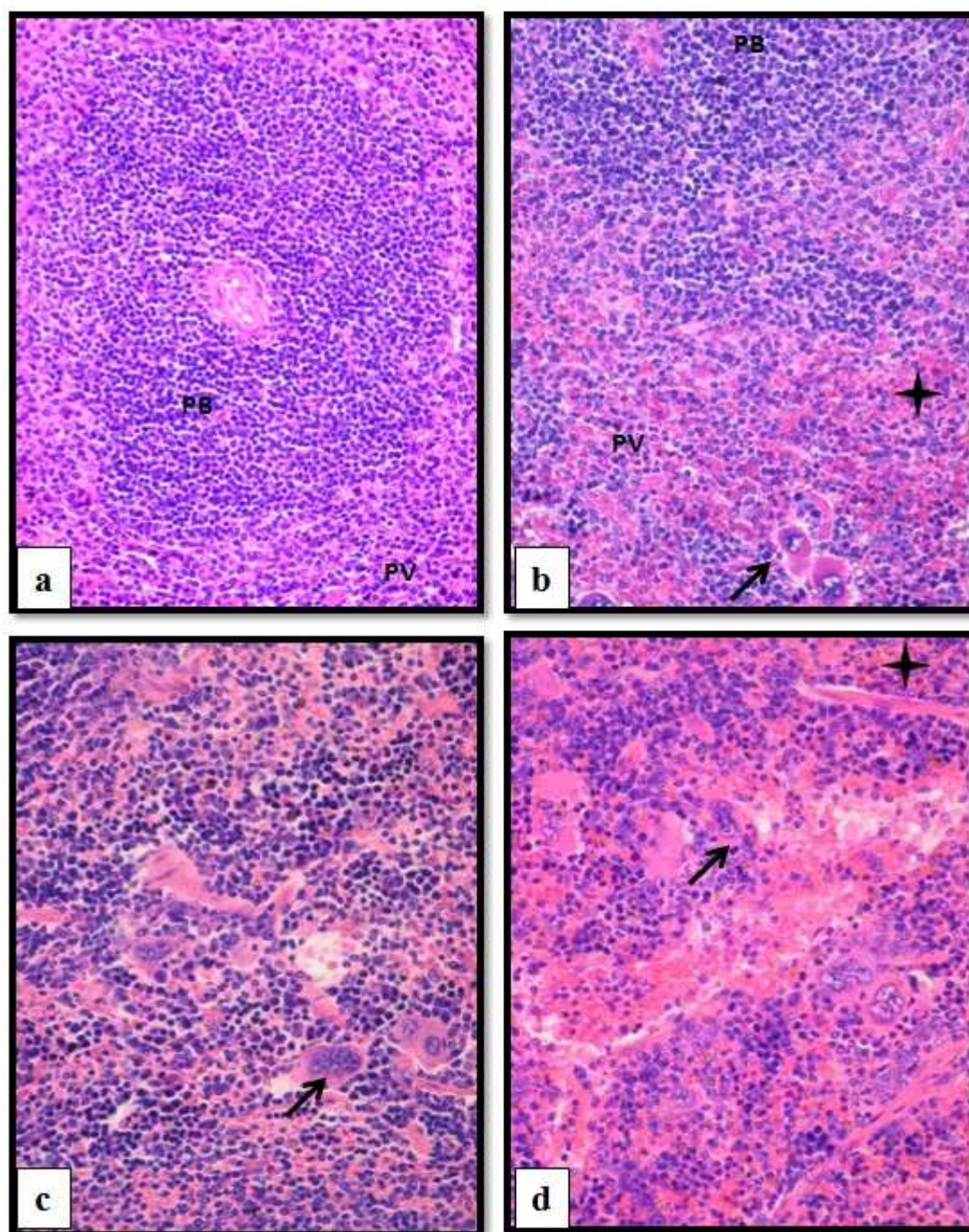


Figura 12 – Cortes histológicos do baço (HE) (x400):

(a) – controlo NaCl; (b) – 10 mg/kg de extracto de flores; (c) – 100 mg/kg de extracto de flores; (d) – 1000 mg/kg de extracto de flores.

↗ - macrófagos; ✱ - zona hemorrágica; **PB** – Polpa Branca; **PV** – Polpa vermelha

O baço dos animais tratados com CCl_4 apresenta nítida desorganização da polpa branca e da polpa vermelha, zonas de depleção celular e raríssimas células fagocitárias (Figura 13 b); o baço dos animais tratados com CCl_4 e extractos de folhas de *P. tridentatum* apresenta alguma melhoria a nível da organização, quando comparado com o grupo CCl_4 e observa-se grande número de macrófagos (Figura 13 c e d); o baço dos animais tratados com CCl_4 e extractos de flores de *P. tridentatum* ainda apresenta desorganização das polpas (Figuras 13 e e f).

A tabela 11 resume as alterações histológicas verificadas nos animais sujeitos aos vários tratamentos de protecção.

Tabela 11 - Principais alterações histológicas observadas no baço de ratinhos nos tratamentos de protecção.

Alterações Histológicas	Grupo / Tratamento experimental				
	CCl_4	Grupo VII	Grupo VIII	Grupo IX	Grupo X
Desorganização das polpas	+++	++	++	++	++
Aumento dos espaços intercelulares	+++	+	+	+	+
Aumento do n.º de macrófagos	-	++	++	+	+

(-) ausência em todas as lâminas; (+) presente em menos de 25% das lâminas;

(++) presente em 25% a 75% das lâminas; (+++) presente em mais de 75% das lâminas. CCl_4 : grupo controlo positivo.

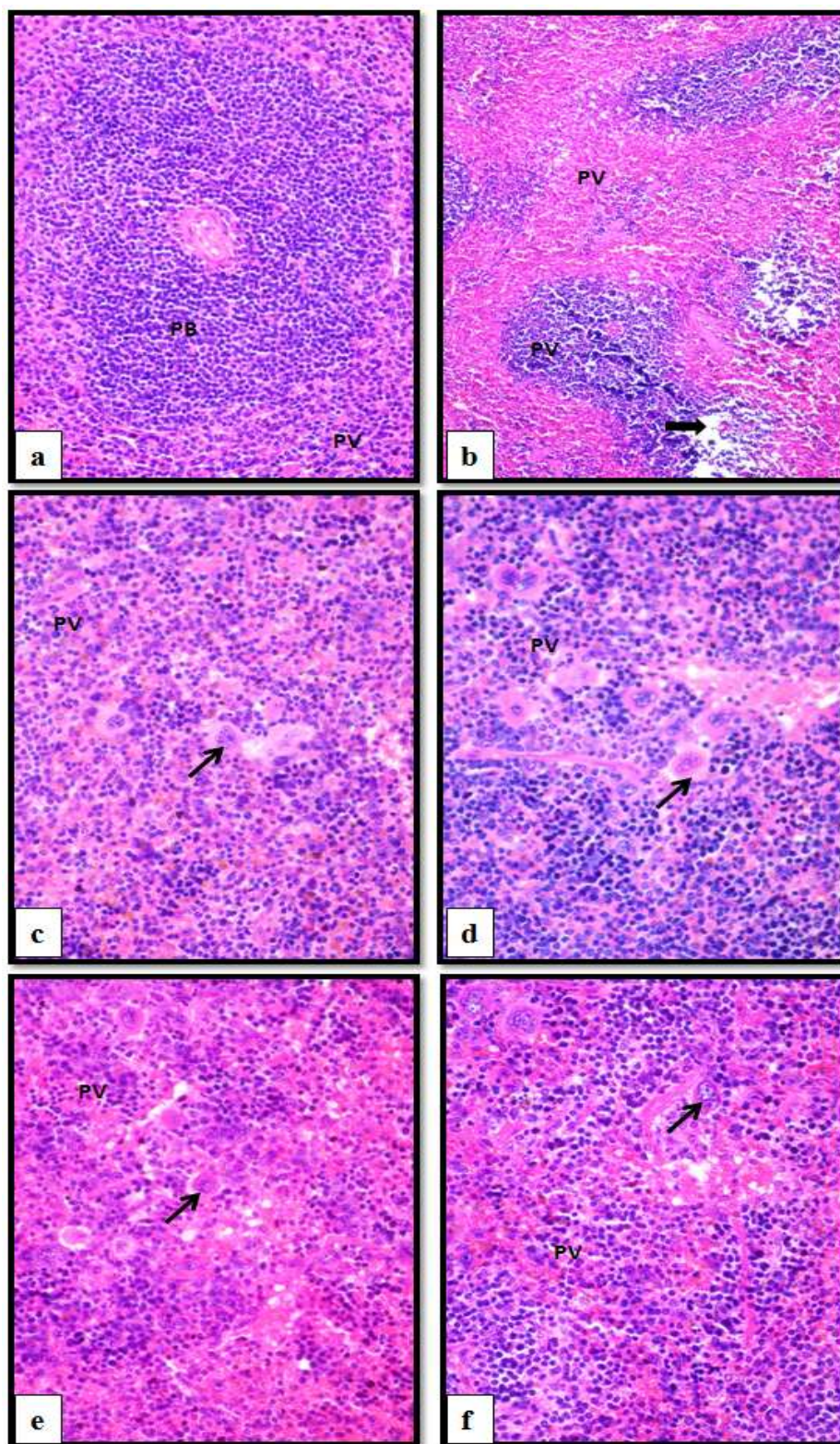


Figura 13 – Cortes histológicos do baço (HE):

(a) – controlo NaCl (x400); (b) – CCl₄ (x100); (c) – CCl₄ + 5 mg/kg de extracto de folhas (x400); (d) – CCl₄ + 10 mg/kg de extracto de folhas (x400); (e) – CCl₄ + 5 mg/kg de extracto de flores (x400); (f) – CCl₄ + 10 mg/kg de extracto de flores (x400).

↗ - macrófagos; ➡ - depleção celular; **PB** – Polpa Branca; **PV** – Polpa vermelha

III.4.3. Alterações histopatológicas no rim

As secções de rim dos ratinhos controlo negativo, injectados com NaCl 0,9%, não apresentaram alterações morfológicas de destaque: a distinção entre as várias zonas do rim foi nítida, não se observaram hemorragias nem alterações celulares, apresentando glomérulos com estrutura morfológica normal. Pelo contrário, o rim dos vários grupos de tratamento com extractos de *P. tridentatum*, com excepção do grupo IV, apresentou algumas alterações histológicas que se encontram registadas na tabela 12.

Tabela 12 - Principais alterações histológicas observadas no rim de ratinhos nos tratamentos de toxicidade.

Alterações Histológicas	Grupo / Tratamento experimental						
	C	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Atrofia glomerular	-	-	+	++	-	+	+
Necrose do epitélio tubular	-	-	+	++	-	+	+
Presença de sangue intersticial	-	+	++	++	-	++	++

(-) ausência em todas as lâminas; (+) presente em menos de 25% das lâminas;
(++) presente em 25% a 75% das lâminas; (+++) presente em mais de 75% das lâminas. C: grupo controlo negativo.

O rim dos animais tratados com extractos de folhas de *P. tridentatum* apresenta sangue intersticial (Figura 14 c); epitélio dos túbulos renais em degenerescência (Figura 14 c) com presença de material no lúmen e desorganização do glomérulo de Malpighi (Figura 14 c e d).

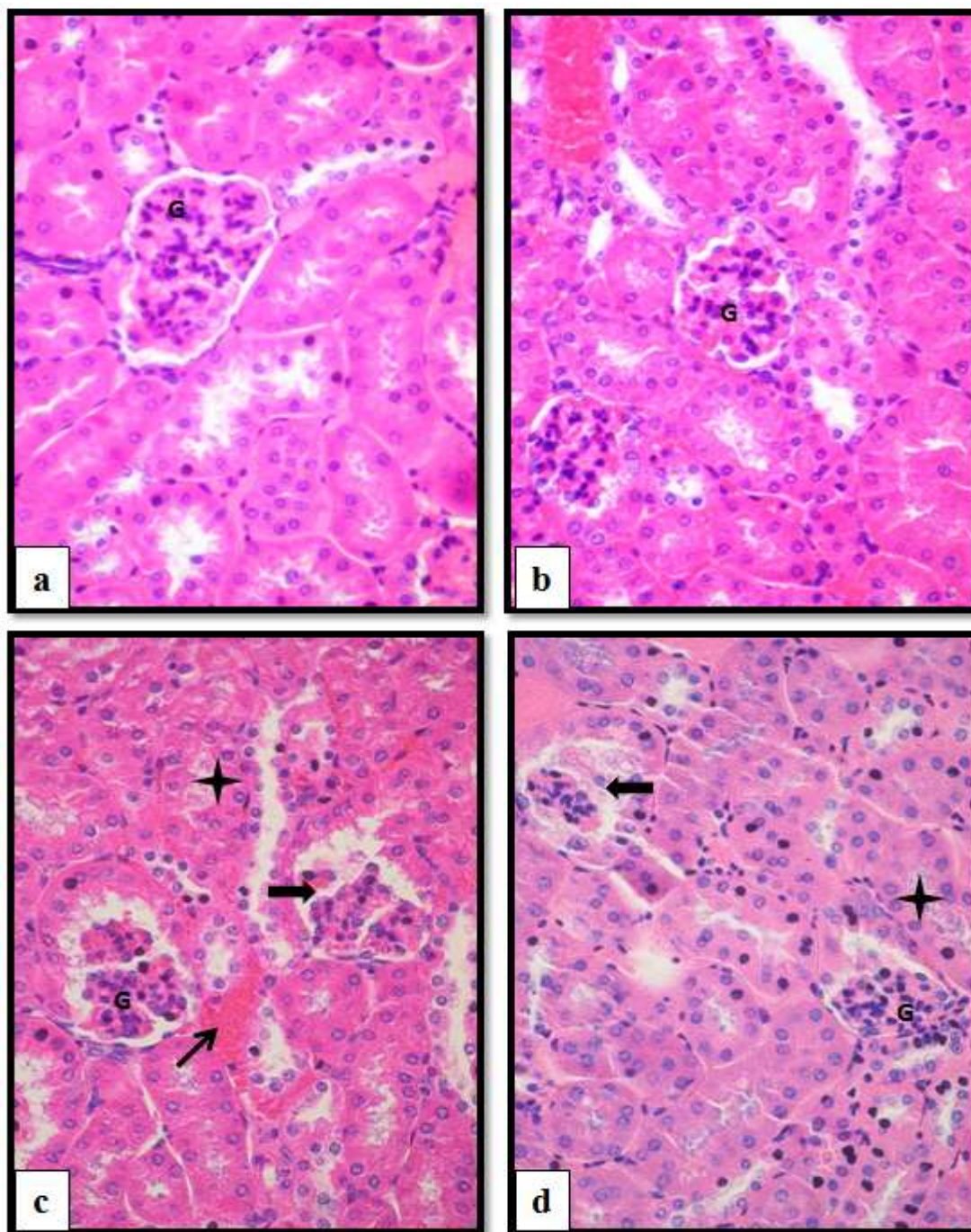


Figura 14 – Cortes histológicos do rim (HE x400):

(a) – controlo NaCl; (b) – 10 mg/kg de extracto de folhas; (c) – 100 mg/kg de extracto de folhas; (d) – 1000 mg/kg de extracto de folhas.

↗ - sangue intersticial; ➡ - desorganização do Glomérulo de Malpighi
✦ - lúmen dos túbulos renais; G – Glomérulo de Malpighi

O rim dos animais tratados com extractos de flores de *P. tridentatum* apresenta alguma degeneração do epitélio dos túbulos renais (Figura 15 c), a presença de material no lúmen dos túbulos renais e sangue intersticial (Figura 15 d).

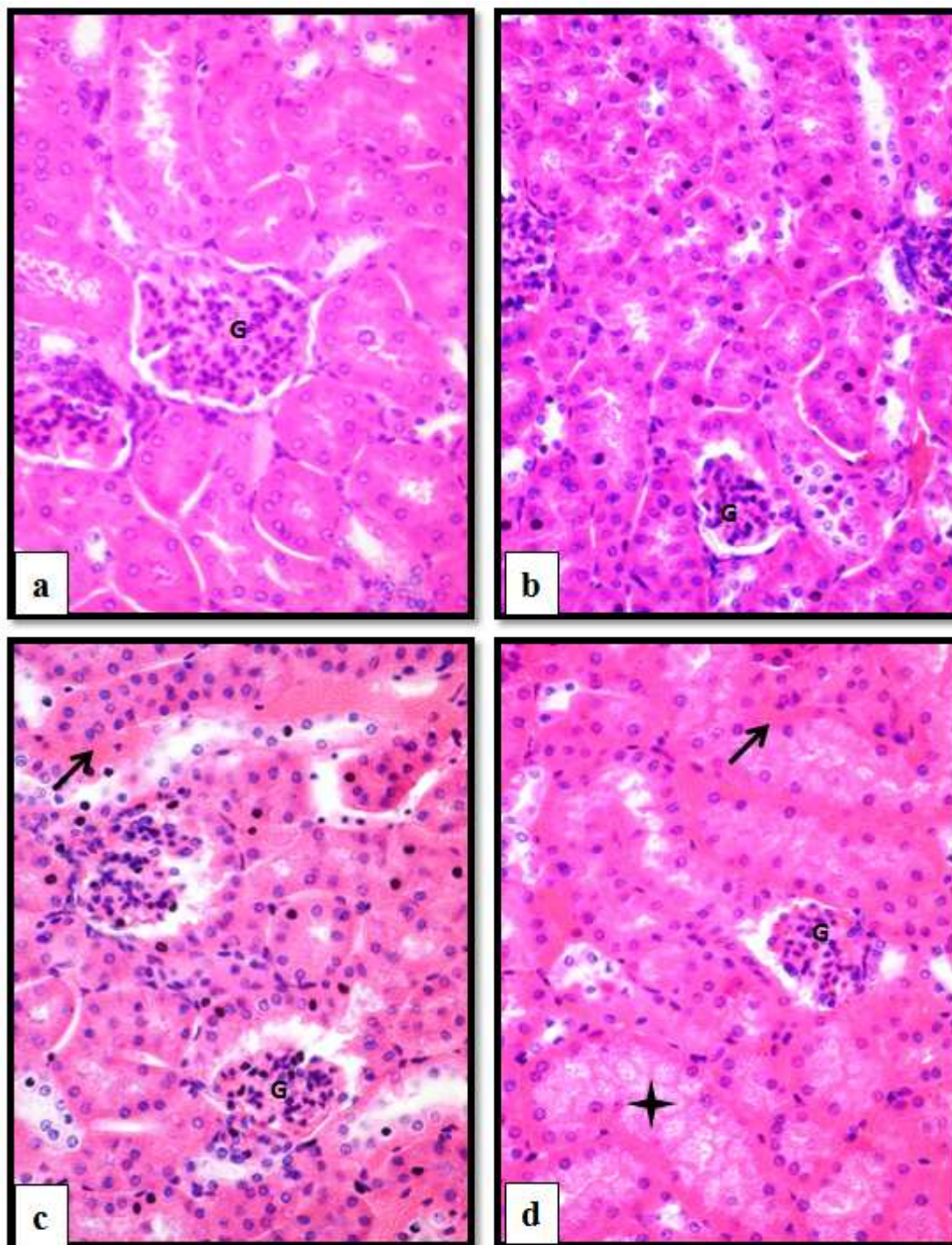


Figura 15 – Cortes histológicos do rim (HE x400):

(a) – controlo NaCl; (b) – 10 mg/kg de extracto de flores; (c) – 100 mg/kg de extracto de flores; (d) – 1000 mg/kg de extracto de flores.

↗ - sangue intersticial; ★ - lúmen dos túbulos renais; G – Glomérulo de Malpighi

O rim dos animais tratados com CCl₄ apresenta hemorragias, degeneração do epitélio dos túbulos renais e desorganização do glomérulo de Malpighi (Figura 16 b); o rim dos animais tratados com CCl₄ e extractos de folhas de *P. tridentatum* apresenta alguma melhoria quando comparado com o grupo CCl₄ mas observa-se degeneração vacuolar, oclusão do lúmen dos túbulos renais e adesão da cápsula de Bowman (Figura 16 c e d); o rim dos animais tratados com CCl₄ e extractos de flores de *P. tridentatum* apresenta hemorragias e presença de material no lúmen dos túbulos renais (Figura 16 e) assim como oclusão do lúmen dos túbulos renais (Figura 16 f).

Tabela 13 - Principais alterações histológicas observadas no rim de ratinhos nos tratamentos de protecção.

Alterações Histológicas	Grupo / Tratamento experimental				
	CCl ₄	Grupo VII	Grupo VIII	Grupo IX	Grupo X
Atrofia glomerular	+++	++	++	+	+
Necrose do epitélio tubular	+++	++	++	+	+
Presença de sangue intersticial	+++	+++	+++	+++	+++

(-) ausência em todas as lâminas; (+) presente em menos de 25% das lâminas; (++) presente em 25% a 75% das lâminas; (+++) presente em mais de 75% das lâminas. CCl₄: grupo controlo positivo.

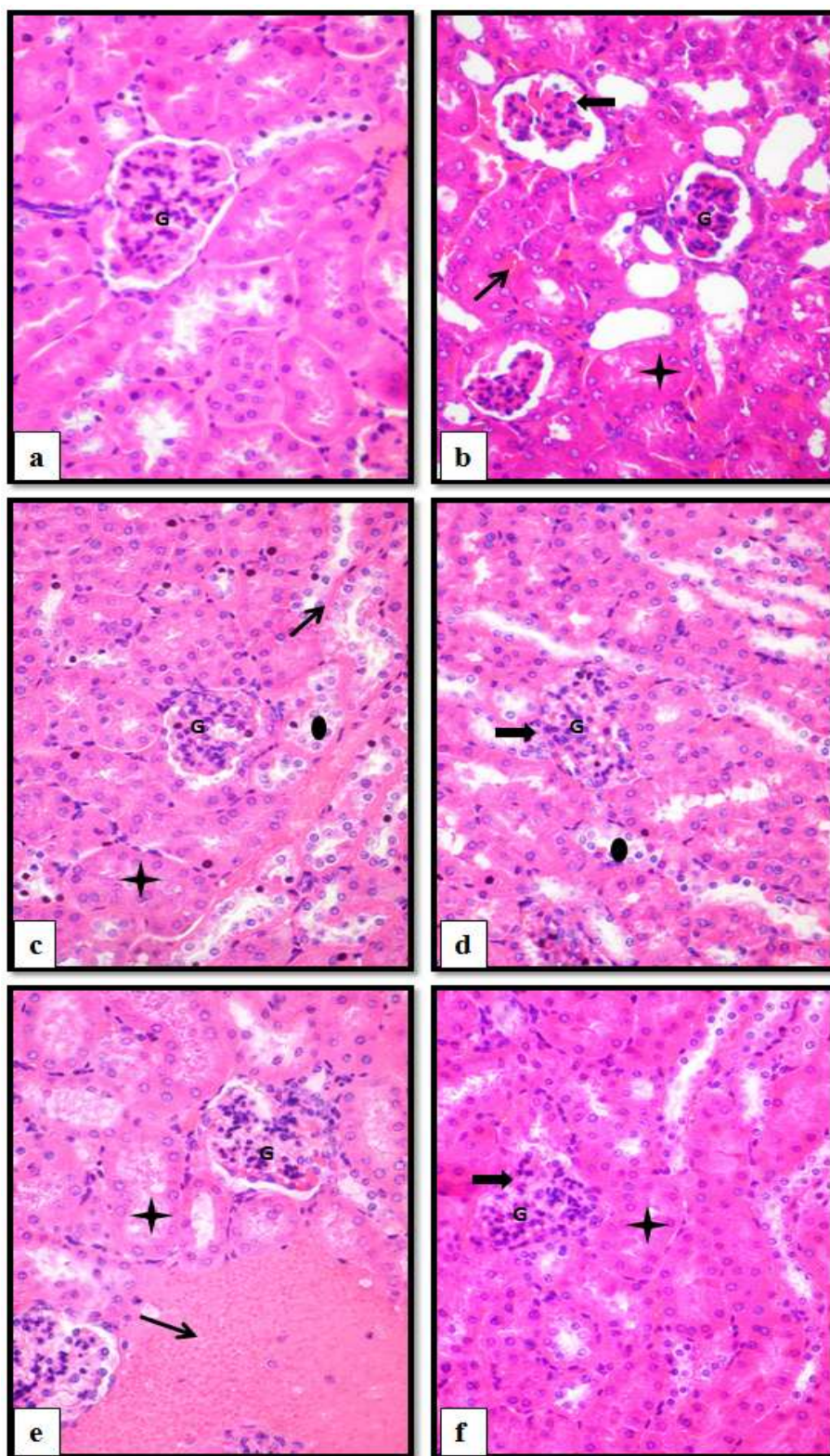


Figura 16 – Cortes histológicos do rim (HE x400):

(a) – controlo NaCl; (b) – CCl₄; (c) – CCl₄ + 5 mg/kg de extracto de folhas; (d) – CCl₄ + 10 mg/kg de extracto de folhas; (e) – CCl₄ + 5 mg/kg de extracto de flores; (f) – CCl₄ + 10 mg/kg de extracto de flores.

↗ - sangue intersticial; ➡ - desorganização do Glomérulo de Malpighi
 ✦ - lúmen dos túbulos renais; ● - vacuolização do epitélio tubular;
 G – Glomérulo de Malpighi

Capítulo IV

Discussão dos Resultados

IV. Discussão dos Resultados

Nos estudos de toxicidade dos extractos de *Pterospartum tridentatum* foi possível observar que, às concentrações de 100 mg/kg e 1000 mg/kg, quer de extractos de folhas quer de flores, ocorreu um maior número de lesões nos órgãos analisados, quando comparado com o grupo controlo (NaCl) e os grupos I e IV. No fígado, as lesões predominantes foram os hepatócitos vacuolizados e a perda dos característicos cordões hepáticos que rodeiam a veia central. No rim, predominaram lesões como a degenerescência do epitélio dos túbulos renais e a presença de material no lúmen destes. Estes efeitos tóxicos dos extractos de *P. tridentatum* podem dever-se à acção pró-oxidante dos compostos fenólicos. Apesar das formas reduzidas dos compostos fenólicos actuarem como antioxidantes, a forma oxidada, radicais fenoxil, pode exibir actividade pró-oxidante sob condições que prolonguem o tempo de vida do radical (Sakihama, 2002). Os polifenóis podem reduzir o ferro (III) em ferro (II) e gerar radicais hidroxil (Scalbert, 2005). Ainda existem reservas acerca do potencial perigo do consumo em grandes doses de compostos dietéticos ricos em isoflavonas, uma vez que alguns têm propriedades citostáticas e citotóxicas, dependendo da concentração (Paulo e Mota-Filipe, 2006).

Nos estudos de protecção, as alterações histopatológicas observadas no fígado, baço e rim no grupo CCl₄ foram as esperadas. O CCl₄ induz fibrose hepática acompanhada tanto pela atrofia hepática como pelo aumento do conteúdo em água. Observou-se um decréscimo da eosinofilia dos hepatócitos da zona centrolobular e da zona média, em comparação com os hepatócitos periféricos uma vez que os hepatócitos centrolobulares têm maior conteúdo em citocromo P-450 e actividade enzimática associada, tornando-os mais susceptíveis à acção de xenobióticos como o CCl₄ (Haschek e Rousseaux, 1998). Um dos principais mecanismos celulares envolvidos na hepatotoxicidade do CCl₄ é a produção de radicais livres e a peroxidação lipídica (Shih *et al.*, 2005). No fígado foi visível a completa desorganização do parênquima hepático com perda dos característicos cordões de hepatócitos, extensas hemorragias a rodear a veia central, hepatócitos vacuolizados e degenerescência celular. A presença de hepatócitos vacuolizados pode ter origem na lipidose hepática, que consiste na acumulação de triglicerídeos nos hepatócitos. Esta acumulação resulta do desequilíbrio provocado pelo

CCl_4 , entre a absorção de ácidos gordos e a sua secreção sob a forma de lipoproteínas de baixa densidade.

Estudos realizados por Bhandarkar e Khan (2004) demonstraram que a clivagem da ligação C-Cl do tetracloreto de carbono leva à formação do radical triclorometil peroxi ($\text{CCl}_3\bullet\text{O}_2^-$), envolvidos nos danos do fígado, assim como nos outros órgãos.

O baço é um órgão pertencente ao sistema imunitário. A sua riqueza em células fagocíticas e o contacto íntimo com o sangue fazem deste órgão um importante filtro fagocítico e imunitário, sendo também responsável pela destruição de eritrócitos envelhecidos ou anormais. Os resultados do presente trabalho demonstraram nítida desorganização das duas polpas, zonas de depleção celular e raríssimas células fagocitárias no grupo controlo positivo. Ao longo dos tratamentos de protecção, registaram-se nítidas melhorias na organização histológica do baço, provavelmente devido à acção dos componentes bioactivos de *P. tridentatum*. A acção destes componentes quer no fígado como no rim, terão também influenciado a alteração do número de leucócitos no baço, uma vez que o envolvimento do sistema imunitário na resposta aos tecidos danificados levanta a possibilidade de que pode influenciar a regeneração de tecidos ou órgãos (Godwin e Brockes, 2006).

O rim é constituído por unidades funcionais designadas por nefrónios. Vários estudos já revelaram que o tratamento com CCl_4 provoca um significativo aumento do conteúdo proteico nos rins. A administração de CCl_4 resultou em danos oxidativos das proteínas e a sua acumulação devido à pobre degradação pelas vias proteossomal e lisossomal, provocando disfunção metabólica dos rins (Khan *et al.*, 2009). Na literatura encontram-se estudos com plantas medicinais com propriedades nefroprotectoras, via actividade antioxidante e/ou de remoção de radicais livres devido à concentração elevada de flavonóides e alcalóides que estas contêm (Miller e Rice-Evans, 1997 in Olagunju, 2009).

A protecção do fígado, baço e rim dos ratinhos aos quais foram administrados extractos de plantas e CCl_4 pode dever-se às propriedades anti-peroxidativas desses extractos. A análise histológica do fígado, baço e rim revelou uma protecção significativa destes órgãos por acção dos extractos de folhas e flores de *P. tridentatum* nas concentrações de 5 mg/kg e 10 mg/kg, principalmente nesta última.

Estudos de protecção mostraram que as plantas têm ingredientes activos que são capazes de remover radicais livres nos sistemas vivos (Mitra *et al.*, 1998 in Opoku *et al.*, 2009). Pode-se assim especular que a acção protectora de *P. tridentatum* pode dever-se à inibição da formação de $\bullet\text{CCl}_3$ ou inibição da peroxidação, por radicais, dos lípidos membranares, da estabilização da membrana celular, regeneração de células e activação de enzimas antioxidantes (Bhandarkar e Khan, 2004). Os efeitos protectores dos extractos de *P. tridentatum* devem-se à presença, na sua constituição fitoquímica, de vários compostos fenólicos, como os flavonóides que são antioxidantes naturais. O flavonóide quercetina tem mostrado ser o mais activo, uma vez que apresenta todas as características estruturais para a sua actividade antioxidante (Pietta, 2000). Já Gasparin e seus colaboradores (2003) referiram que a quercetina, assim como a maioria dos flavonóides naturais, são, pelo menos, parcialmente transformados no fígado. Alguns dos efeitos da quercetina (estimulação da glicólise) pode ser atribuída à sua acção no metabolismo energético da mitocôndria, como por exemplo, a desactivação da fosforilação oxidativa.

Capítulo V

Conclusões e

Perspectivas Futuras

V.1 Conclusões

O presente trabalho permitiu verificar que os extractos de folhas e flores de *Pterospartum tridentatum*, nas concentrações mais elevadas, tem acção tóxica sobre os tecidos como se verificou, no fígado, pela presença de vacuolização dos hepatócitos, perda dos característicos cordões de hepatócitos e pela presença pontual de fibrose. No baço observou-se ligeira desorganização das polpas e aumento do número de células fagocíticas. No rim observam-se hemorragias, oclusão do lúmen dos túbulos renais e alguma desorganização da cápsula de Bowman.

Na segunda fase deste trabalho, ao serem administrados extractos de folhas e flores de *P. tridentatum* após a administração de CCl₄, observou-se uma significativa regeneração nestes órgãos, principalmente na concentração de 10 mg/kg de extracto de folhas e flores.

Conclui-se assim que os extractos de *P. tridentatum* apresentaram capacidade protectora do baço, fígado e rim ao longo dos 10 dias de tratamento a que os ratinhos foram submetidos, capacidade esta que provavelmente se deve à composição rica em compostos fenólicos com acção antioxidante.

V.2 Perspectivas Futuras

Os resultados histopatológicos obtidos na presente dissertação permitem inferir que os extractos de *Pterospartum tridentatum* têm acção hepatoprotectora de uma forma dependente da concentração. No entanto, este trabalho pode ser complementado e aprofundado, fazendo testes mais meticolosos, tais como:

- Análise fitoquímica da população de *P. tridentatum* utilizada, uma vez que alguns dos constituintes e a sua concentração relativa pode variar de população para população;

- Utilizar outros métodos de extracção de extractos, dado que o método utilizado no presente estudo pode ter eliminado alguns óleos essenciais importantes na acção regeneradora ou hepatoprotectora;
- Realizar ensaios bioquímicos para observação da actividade de diversas enzimas que actuam principalmente no fígado e rim, como a catalase, Glutathione-S-Transferase, GSH e peroxidação lipídica;
- Análise do plasma sanguíneo para conhecer os teores de bilirrubina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, alcalina fosfatase (entre outras), de modo a determinar a integridade do fígado e rim nas várias concentrações de extracto administradas.

Capítulo VI
Referências
Bibliográficas

VI Referências Bibliográficas

- ✓ Agency for Toxic Substances and Diseases Registry (2005) *Toxicological Profile for Carbon Tetrachloride*. Georgia, U.S.A..
- ✓ Amida, M. B., Yemitan, O. K., and Adeyemi, O. O. (2007) Toxicological assessment of the aqueous root extract of *Sansevieria liberica* Gerome and Labroy (Agavaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **113**: 171-175.
- ✓ Benson J.M., Tibbetts B.M., Thrall K.D. and Springer D.L. (2001) Uptake, tissue distribution, and fate of inhaled carbon tetrachloride: Comparison of rat, mouse, and hamster. *Inhalation Toxicology*, **13**:207-217.
- ✓ Bhandarkar M.R. and Khan A. (2004) *Antihepatotoxic effect of Nymphaea stellata Willd., against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats*. *Journal of Ethnopharmacology*, **91**: 61-64.
- ✓ Birt D.F., Hendrich S., Wang W. (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, **90**: 157– 177
- ✓ Bruneton J. (1999) *Pharmacognosy, phytochemistry medicinal plantas*. Paris: Lavoisier. pp. 310-326.
- ✓ Burkitt H. G., Young B. and Heath, J. W. (1994) *Wheater - Histologia Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. pp. 214-303.
- ✓ Castroviejo S. (1999) *Flora Ibérica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares* (Vol. VII (I) Leguminosae). Madrid: Real Jardín Botánico.
- ✓ Diaz, G. J. (2000) Basolateral and canalicular transport of xenobiotics in the hepatocyte: A review. *Cytotechnology*, **34**: 225-236.
- ✓ Duthie G. e Crozier A. (2000) Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **3**: 447-451.
- ✓ Gasparin F.R.S., Salgueiro-Pagadigorria C.L., Bracht L., Ishii-Iwamoto E.L., Bracht A., Constantin J. (2003) Action of quercetin on glycogen catabolism in the rat liver. *Xenobiotica*. Vol. 33, **6**:587 – 602.
- ✓ Godwin J.M. e Brockes J. P. (2006) Regeneration, tissue injury and the immune response. *J. Anatomy*, **209**: 423-432.
- ✓ Grosso A. C., Costa M. M., Ganço L., Pereira A. L., Teixeira G., Lavado J. M. (2007) Essential oil composition of *Pterospatum tridentatum* grown in Portugal. *Food Chemistry*, **102**: 1083-1088.

- ✓ Halliwell B., Rafter J., Jenner A. (2005) Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81**: 268S-276S.
- ✓ Halliwell B. (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine*, **46**: 531-542.
- ✓ Haschek, M. W., and Rousseaux, C. G. (1998) *Fundamentals of toxicological pathology*. San Diego, USA: Academic Press. pp.127-151.
- ✓ Haussinger, D. (1996) Physiological functions of the liver. In G. R. and W. U., *Comprehensive Human Physiology: From Cellular Mechanisms to Integration*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 1369-1391.
- ✓ Hinton, R. H. and Grasso, P. (1995) Hepatotoxicity. In B. Ballantyne, T. Marrs, and T. Turner, *General and Applied Toxicology*. Basingstoke: Macmillan Press Ltd. pp. 555-598.
- ✓ Janakat S. and Al-Merie H. (2002) Optimization of the dose and route of injection and characterization of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **48**: 41-44.
- ✓ Junqueira, L. C., and Carneiro, J. (2008) *Basic Histology, text and atlas* (11th edition). McGraw-Hill editora. Cap. 14, 16 e 19.
- ✓ Kedderis, G. L. (1996) Biochemical basis of hepatocellular injury. *Toxicologic Pathology*, **24**: 77-83.
- ✓ Khan M.R., Rizvi W., Khan G.N., Khan R.A., Shaheen S. (2009) Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats: protective role of *Digera muricata*. *Journal of Ethnopharmacology*, **122**: 91-99.
- ✓ Lai E.K, McCay P.B., Noguchi T. (1979) *In vivo* spin-trapping of trichloromethyl radicals formed from carbon tetrachloride. *Biochemistry Pharmacology*, **28**: 2231-2235.
- ✓ Lean M. E., Noroozi M., Kelly I., Burns J., Talwar D., Sattar N. and Crozier A. (1999) Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes*, **48**: 176-181.
- ✓ Liu R.H. (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, **134**: 3479S-3485S.

- ✓ Loguercio C. and Federico A. (2003). Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, **34**: 1-10.

- ✓ Mandel S., Packer L., Youdim M.B. and Weinreb O. (2005) Proceedings from the "Third International Conference on Mechanism of Action of Nutraceuticals". *Journal of Nutritional Biochemistry*, **16**: 513-520.

- ✓ Manno, M., Ferrara, R., Cazzaro S., Rigotti P., Ancona E. (1992) Suicidal inactivation of human cytochrome P-450 by carbon tetrachloride and halothane *in vitro*. *Pharmacology & Toxicology*, **70**: 13-18.

- ✓ Moon Y.J., Wang X., Morris M.E. (2006) Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology In Vitro*, **20**: 187-210.

- ✓ Moslen M. T. (2001) Toxic responses of the liver. In C. D. Klaassen, Casarett and Doull's *Toxicology: The basic Science of Poisons* (6th Edition). Cap. 13, pp. 471-489.

- ✓ Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L. and Exon, J. H. (2006) A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. *Food Science and Nutrition*, **46**: 161-183.

- ✓ Noguchi T., Fong K-L, Lai E.K., Olson L., Mccay P. B. (1982) Selective early loss of polypeptides in liver microsomes of CCl₄-treated rats. Relationship to cytochrome P-450 content. *Biochemistry Pharmacology*, **31**: 609-614.

- ✓ Olagunju J.A., Adeneye A.A., Fagbohunka B.S., Bisuga N.A., Ketiku, A.O. (2009) Nephroprotective activities of the aqueous extract of *Carica papaya* Linn. In carbon tetrachloride induced renal injured wistar rats: a dose- and time-dependent study. *Biology and Medicine*, **1**: 11-19.

- ✓ Opoku A.R., Ndlover I.M., Terblanche S.E., Hutching A.H. (2007) *In vivo* hepatoprotective effects of *Rhoicissus tridentate* subsp. *Cuneifolia*, a tradicional Zulu medicinal plant, against CCl₄-induced acute liver injury in rats. *South African Journal of Botany*, **73**: 372-377.

- ✓ Parkinson A. (1996) Biotransformation of xenobiotics. In C. D. Klassen, *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (5th ed.) New York: McGraw-Hill. pp. 113-186.

- ✓ Paulo A. and Mota-Filipe H. (2006) Effects of some natural 5-hydroxy-isoflavones on cultured human endothelial cells in presence and absence of hydrogen peroxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **58**: 101-105.

- ✓ Paulo A., Martins, S., Branco, P., Dias, T., Borges, C., Rodrigues, A. I. (2008) The opposing effects of the flavonoids isoquercitrin and sissotrin, isolated from *Pterospartum tridentatum*, on oral glucose tolerance in rats. *Phytotherapy Research*, **22**: 539-543.
- ✓ Puviani A. C., Ottolenghi C., Tassinari B., Pazzi P. and Morsiani E. (1998) An update on high-yield hepatocyte isolation methods and on the potential clinical use of isolated liver cells. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, **121**: 99-109.
- ✓ Pietta P-G. (2000) Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**: 1035-1042.
- ✓ Recknagel R.O., Glende E.A., Hriszkewycz A.M. (1977) Chemical mechanisms in carbon tetrachloride toxicity. In: Pryor WA, ed. *Free radicals in biology*. Volume III. New York, NY: Academic Press, Inc.:97-132.
- ✓ Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G., (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159.
- ✓ Sanzgiri U.Y.; Srivattsan V; Muralidhara S. (1997) Uptake, distribution, and elimination of carbon tetrachloride in rat tissue following inhalation and ingestion exposures. *Toxicological Applied Pharmacology*, **143**: 120-129.
- ✓ Sakihama Y.; Cohen M. F.; Grace S. C.; Yamasaki H. (2002). Plant phenolic antioxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, **177**: 67 – 80.
- ✓ Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L. (2005) Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Food Science and Nutrition* , **45**: 287–306.
- ✓ Schnellmann R.G. (1996) Toxic responses of the kidney. In C. D. Klassen, *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (5th ed.) New York: McGraw-Hill. pp. 491-512.
- ✓ Shah H., Hartman S. P. and Weinhouse S. (1979) Formation of Carbonyl Chloride in Carbon Tetrachloride Metabolism by Rat Liver in Vitro. *Cancer Research*, **39**: 3942-3947.

- ✓ Shih C. C., Wu Y. W., Lin W. C. (2005) Aqueous extract of *Anoectochilus formosanus* attenuate hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Phytomedicine*, **12**: 453 – 460.
- ✓ Sipes I. G. and Gandolfi A. J. (1991) Biotransformation of toxicants. In C. D. Klassen, *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (4th ed.) New York: Pergamon Press. pp. 88-126.
- ✓ Spencer J. P., Mohsen M. M. and Rice-Evans C. (2004) Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **423**: 148–161.
- ✓ Thrall K.D, Vucelick M.E, Gies R.A. (2000) Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *Journal of Toxicological Environmental Health A*, **60**: 531-548.
- ✓ van Zutphen L. F., Baumans V. and Beynen A. C. (1999) *Principios de la Ciencia del Animal de Laboratorio: Una contribución al empleo y cuidado humanitario de los animales y la calidad de los resultados experimentales* (española Secal ed.). Elsevier.
- ✓ Vitaglione P., Morisco F. and Caporaso N. (2004) Dietary antioxidant compounds and liver health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**: 575-586.
- ✓ Vítor R. F., Mota-Filipe H., Teixeira G., Borges C., Rodrigues A. I., Teixeira A. and Paulo A. (2004) Flavonoides of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, **93**: 363-370.
- ✓ Williams R. J., Spencer J. P. and Rice-Evans C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, **36**: 838 – 849.